U Lohröder

1971

Aus der Medizinischen Klinik des Städt. Krankenhauses
Kaiserslautern

Direktor: Prof. Dr. med. Hellmut Hartert

In-vitro-Untersuchungen zur Rolle des Magnesiums im Gerinnungsablauf

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von
UTE SCHRÖDER
geb. am 20. 12. 1942 in Königsberg

Dekan: Prof. Dr. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. H. Hartert

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Prüfung abgelegt
am 13. Dezember 1971

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	METHODIK	2
C.	UNTERSUCHUNGEN	
	I Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von:	
	a) Mg^{++}	4
	b) ATP	11
	c) Mg^{++} und ATP	16
	d) Ca^{++}	20
	e) Ca^{++} und ATP	24
	II PTT-Bestimmungen unter Zusatz von:	
	a) Mg^{++}	27
	b) Ca^{++}	
	c) Mg^{++} und Ca^{++}	
	III Thrombozytenausbreitung und -aggregation:	
	a) Thrombozytenausbreitung unter Zugabe von Mg^{++}	32
	b) Thrombozytenaggregation unter Zusatz von Mg^{++}	38
	c) Thrombozytenausbreitung unter Zusatz von Mg^{++} und ATP	42
	d) Thrombozytenaggregation unter Zusatz von Mg^{++} und ATP	43
D.	DISKUSSION	44
E.	ZUSAMMENFASSUNG	49
F.	LITERATURVERZEICHNIS	50
	NACHWORT	
	LEBENSLAUF	

A. EINLEITUNG

Die Blutplättchen spielen eine maßgebliche Rolle im Blutstillungsmechanismus. Ausgeprägte Störungen der plasmatischen Gerinnung treten durch das Fehlen bestimmter Plättchenfaktoren auf. Diese Faktoren werden bei Beeinträchtigung des Energiepotentials der Plättchen freigesetzt.
Die Steuerung des Energiepotentials erfolgt über die membranständigen ATPasen, die unter ATP-Verbrauch der Aufrechterhaltung des intrazellulären Elektrolytgradienten dienen. Ihre Funktion wird insbesondere durch die zweiwertigen Kationen Calcium und Magnesium mitbestimmt. Ausgehend von den obigen gerinnungsphysiologischen und -biochemischen Verhältnissen wurde die Rolle von Magnesium-Ionen im Gerinnungsablauf erneut aufgegriffen.

In den bisher vorliegenden Arbeiten wurde die Wirkung von Mg^{++} vor allem unter den folgenden Gesichtspunkten geprüft:

a) Mg^{++} als Antikoagulans mit verschiedenen Angriffspunkten:

HARTERT und SCHIMPF (1957), EGGELING (1959), THIES (1959) und WILLE (1960) konnten in In-vivo-Versuchen keine wirkungsvollen gerinnungshemmenden Effekte feststellen, wie sie dagegen von HACKETHAL (1949), VOELKEL (1953), ZAHNERT und OLOFFS (1960), sowie DURLACH (1967) beschrieben wurden.

Für die gerinnungshemmende Wirkung von Mg^{++} wurden folgende Erklärungen diskutiert (Zusammenfassung bei ZAHNERT und OLOFFS, 1960):

1. Hemmung der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch Kompetition mit Ca^{++}
2. Thrombozytenstabilisierende Wirkung durch Aggregationshemmung.
3. Steigerung der Fibrinolyse.

b) Spezielle Wirkung von Mg^{++} auf die Thrombozytenausbreitung und -aggregation

In neueren Untersuchungen von BREDDIN (1968) ergab sich, daß für die Ausbreitung der Plättchen außer Mg^{++} und Glucose keine weiteren Plasmabestandteile notwendig sind. Auch für die Aggregation der Thrombozyten ist nach BRINKHOUS, READ, MASON (1964) und BREDDIN (1968) nur Mg^{++} notwendig. BORN und CROSS (1963) fanden, daß Mg^{++} bei der durch ADP induzierten Aggregation Ca^{++} ersetzen kann.

c) Der Einfluß von Mg^{++} auf die Retraktion

Untersuchungen von BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (1961) ergaben, daß das kontraktile Protein Thrombosthenin gleichzeitig als Ca^{++} - und Mg^{++} -abhängige ATPase wirkt.

d) Der Einfluß von Mg^{++} auf den oxydativen und glykolytischen Stoffwechsel

Dieser wurde insbesondere von GROSS und Mitarbeitern untersucht. Das Mg^{++} wird als Co-Faktor benötigt.

B. METHODIK

Zur Untersuchung wurde spontan sedimentiertes Normalplasma von gesunden Blutspendern mit Thrombozytenzahlen zwischen 200 000 und 500 000 (Zählung aus dem Sediment) und einem normalen Fibrinogengehalt von 180 - 500 mg% (Bestimmung als Hitzefibrinogen nach SCHULZ (1955)) verwandt.
Die Blutentnahme erfolgte als Citratblut (1 Teil 3,8 % Citratlösung + 9 Teile Vollblut) mit Einmalspritzen und silikonisierten Flügel- oder Einmalkanülen der Größe 1.
Die Spontan-Sedimentationszeit des Citratplasmas betrug jeweils 60 min. Mit Silikontechnik wurde eine Schädigung der Thrombozyten weitgehend eingeschränkt.
Alle Arbeitsvorgänge wurden in Plastikröhrchen und mittels silikonisierter Pipetten durchgeführt. Die Ausbreitung und Aggregation erfolgte auf Kunststoffoberflächen. Jede Untersuchung wurde, wenn nicht anders vermerkt, 4-6 fach durchgeführt.

Folgende Testmethoden wurden angewandt:

1. Thrombelastographie nach H. HARTERT (1948, 1952)

Der standardisierte Kontrollansatz war:
0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,1 ml Michaelispuffer pH = 7,6; 0,028 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 Mol/l

In den Mg^{++}- und Mg^{++} u n d ATP-Belastungsreihen wurde der Michaelispuffer teilweise durch verschiedene molare Mg^{++}- u n d ATP-Lösungen ersetzt, wobei die Konstanthaltung des pH-Wertes durch Kontrolle gesichert wurde.
In den Ca^{++} und Ca^{++} u n d ATP-Belastungsreihen wurden 0,025 Mol/l Ca^{++} durch verschieden molare Ca^{++}-Konzentrationen ersetzt.

2. Thrombozytenausbreitung und -aggregation nach BREDDIN (1965, 1968)

Die Thrombozytenausbreitung gilt als der empfindlichste Test für die Plättchenfunktion.
Die Plättchenaggregation dient insbesondere dem Nachweis einer gesteigerten Thrombozytenfunktion.
In unseren Versuchen zur Thrombozytenausbreitung und -aggregation wurde für die Mg^{++}-Belastungen anstelle des Puffers im standardisierten Kontrollansatz:

0,2 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
1,8 ml Trispuffer pH = 7,4; 0,05 Mol/l

Mg^{++} in steigender Konzentration zugesetzt.

3. PTT-Bestimmung nach PROCTOR und RAPAPORT (1961)

Die PTT-Bestimmungen wurden durchgeführt, um die Relationen zwischen den beiden Kationen Mg^{++} und Ca^{++} zu prüfen. Plättchenfaktor 3 wurde in Form von Tachostyptest zugesetzt und damit konstant erhalten. Der geringfügig modifizierte Kontrollansatz enthielt:
0,1 ml Citratplasma (zentrifugiert 15 min bei 3 000 U/min)
0,1 ml Trispuffer pH = 7,4; 0,05 Mol/l
0,1 ml Tachostyptest (1:50 in Tris)
0,1 ml $CaCl_2$; 0,025 Mol/l

REAGENTIEN für die METHODEN 1 - 3 :

$MgCl_2$ pro analysis (MERCK)
$CaCl_2$ pro analysis (MERCK)
Adenosin-5-triphosphat-Na_2-Salz (SERVA)

Diese Substanzen wurden jeweils gelöst in einer

Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung (Michaelispuffer)
pH = 7,6; 0,028 Mol/l (BEHRING-WERKE)

Die Einhaltung dieses pH-Wertes wurde in allen Ansätzen durch Kontrollen gesichert.

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan pro analysis (MERCK), 0,05 Mol/l, pH 7,4
$CaCl_2$ m/40 (BEHRING-WERKE)
Na-Citrat 3,8% zur Blutentnahme (MERCK)
Tachostyptest (HORMONCHEMIE MÜNCHEN)

C. UNTERSUCHUNGEN

I a) Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von Mg^{++}

1. Versuche

TEG-Ansätze:

0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,075 - 0,25 ml Michaelispuffer pH = 7,6; 0,028 Mol/l
0,025 - 0,075 ml $MgCl_2$; 0,5, 0,1 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 Mol/l

2. Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse werden in den Tabellen 1 - 2 und den Abbildungen 1 - 3 veranschaulicht.
Zwischen den Endkonzentrationen 0,0025 - 0,01 Mol/l Mg^{++} erhält man eine Verkürzung der r-Zeit und k-Zeit bei einer Erhöhung der maximalen Gerinnselfestigkeit.
Die Erhöhung der Mg^{++}-Konzentration über 0,01 Mol/l führt zu einer zunehmenden Verlängerung der r- und k-Zeiten bis schließlich bei 0,035 Mol/l Mg^{++} keine Gerinnselbildung mehr auftritt. Die maximale Gerinnselfestigkeit bleibt bei r-Zeiten bis zu 80 min weitgehend im Normbereich. Vereinzelt treten sogar Erhöhungen der Maximalelastizität trotz der stark verzögerten Gerinnselbil-

dungszeiten auf, was sich besonders an gealterten Plasmen zeigen läßt.

3. Besprechung der Ergebnisse

Mg^{++}-Zusätze zu Normalplasmen haben in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration einen besonderen Einfluß auf den Anfangsteil der TEG-Kurve in Form von Verkürzungen bzw. Verlängerungen der r- und k-Zeit. Die Verkürzung von r und k bei geringer Mg^{++}-Zufuhr weist daraufhin, daß die Gerinnungseinleitung durch die vorgegebene Ca^{++}-Konzentration offenbar nicht optimal ist.

Bei Durchrechnung der Ionenkonzentrationen ergibt sich, daß im plättchenreichen Plasma 48 /uval Citrat/ml vorliegen. Davon gehen 5 /uval/ml an Ca^{++} und 1 /uval/ml an Mg^{++} ab, so daß 42 /uval/ml Citrat übrigbleiben. Dieser errechnete Wert ist eher zu niedrig, da bei Abrechnung des Calciums das Gesamt-Calcium eingesetzt wurde und nicht nur die freie, nicht eiweißgebundene Fraktion. Im TEG-Ansatz liegen dann 21 /uval/ml Citrat bei 20 /uval/ml Calcium vor. Ein geringer Citratüberschuß besteht also.

Bei Zugabe von 2 /uval/ml - 5 /uval/ml Mg^{++} kommt es zu der beschriebenen Verkürzung von r und k im TEG. Eine optimale Gerinnselbildung tritt demnach ein, wenn die Citrat-Konzentration gerade kompensiert wird. Die Magnesium-Ionen wirken dann innerhalb eines relativ scharfen Konzentrationsoptimums gerinnungsfördernd.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Veränderungen von r und k bei Zusatz von Mg^{++} läßt an eine enzymatische Reaktionsbeeinflussung denken. Da Mg^{++} Co-Faktor der ATPasen ist, erscheint eine enzymatische Beeinflussung u.a. der Membran-ATPase, des oxydativen und glykolytischen Stoffwechsels möglich.

Eine Aussage, welche Reaktionsabläufe besonders betroffen werden, kann mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode nicht gemacht werden. Zur Klärung, welche Thrombozytenfunktionsveränderungen durch Mg^{++}-Zugabe ausgelöst werden, wurden Thrombozytenausbreitungen und -aggregationen unter ähnlichen Belastungen vorgenommen. (Kap. III).

4. Zusammenfassung

Mg^{++}-Zusatz führt bis zu einer Konzentration von 5 /uval/ml zu einer Verkürzung von r und k im TEG. Bei höheren Mg^{++}-Konzentrationen werden r und k zunehmend verlängert bis zur völligen Ungerinnbarkeit bei 70 /uval/ml.

Tab. 1

Thromb-Elastograph-Werte unter Zusatz einer aktivierenden Mg^{++}-Konzentration

	Kontroll-werte	$MgCl_2$ 0,00125 M	$MgCl_2$ 0,0025 M	$MgCl_2$ 0,005 M
r	5' 30"	3' 45"	3'	4'
k	3'	1'	30"	1' 45"
r + k	8' 30"	4' 45"	3' 30"	5' 45"
ma	63	68	66	66
mε	170	212	194	194
r	5'	2' 30"	3'	3' 30"
k	3' 30"	3'	1'	1'
r + k	8' 30"	5' 30"	4'	4'
ma	61	64	64	66
mε	156	178	178	194
r	4' 30"	2' 30"	3'	4' 30"
k	4' 30"	1' 45"	2'	1' 45"
r + k	9'	4' 15"	5'	6' 15"
ma	59	62	61	67
mε	144	163	156	203

ab. 2

omb-Elastograph-Werte unter Zusatz von Mg^{++} aktivierender und hemmender Konzentrationen

	Kontroll-wert	0,0025	0,0125	0,02	0,0225	0,025	0,03	0,0325	0,034	0,035 M $MgCl_2$
r	4'	2'	10'	16'	24' 30"	33'	47' 30"	82'		—
k	2'	1' 30"	3' 30"	6' 30"	12' 30"	18' 30"	21' 30"	24' 30"		—
+k	6'	3' 30"	13' 30"	22' 30"	37'	51' 30"	69'	107'		—
na	57	60,5	56	55	55	53	52	52		—
nε	133	153	127	121	121	113	108	108		—
r	5' 30"	3'	12'	17'	24'	35'	49'	75'	228'	—
k	2'	1'	4' 30"	8'	11' 30"	17'	19' 30"	24'	180'	—
+k	7' 30"	4'	16' 30"	25'	35' 30"	52'	68' 30"	99' 30"	408'	—
ma	67	68	65	64	62	62	62	61	32	—
mε	203	212	185	178	163	163	163	156	47	—
r	6'	4'	10' 30"	16'	28'	36'	47'	73'	208'	—
k	6' 30"	2' 45"	7' 30"	9'	12' 30"	15' 30"	17'	20'	188'	—
r+k	12' 30"	6' 45"	16'	25'	40' 30"	51' 30"	64'	93'	396'	—
ma	62	68	64	65	65	64	64	65	34	—
mε	163	212	178	185	185	178	178	185	52	—

Abb. 1

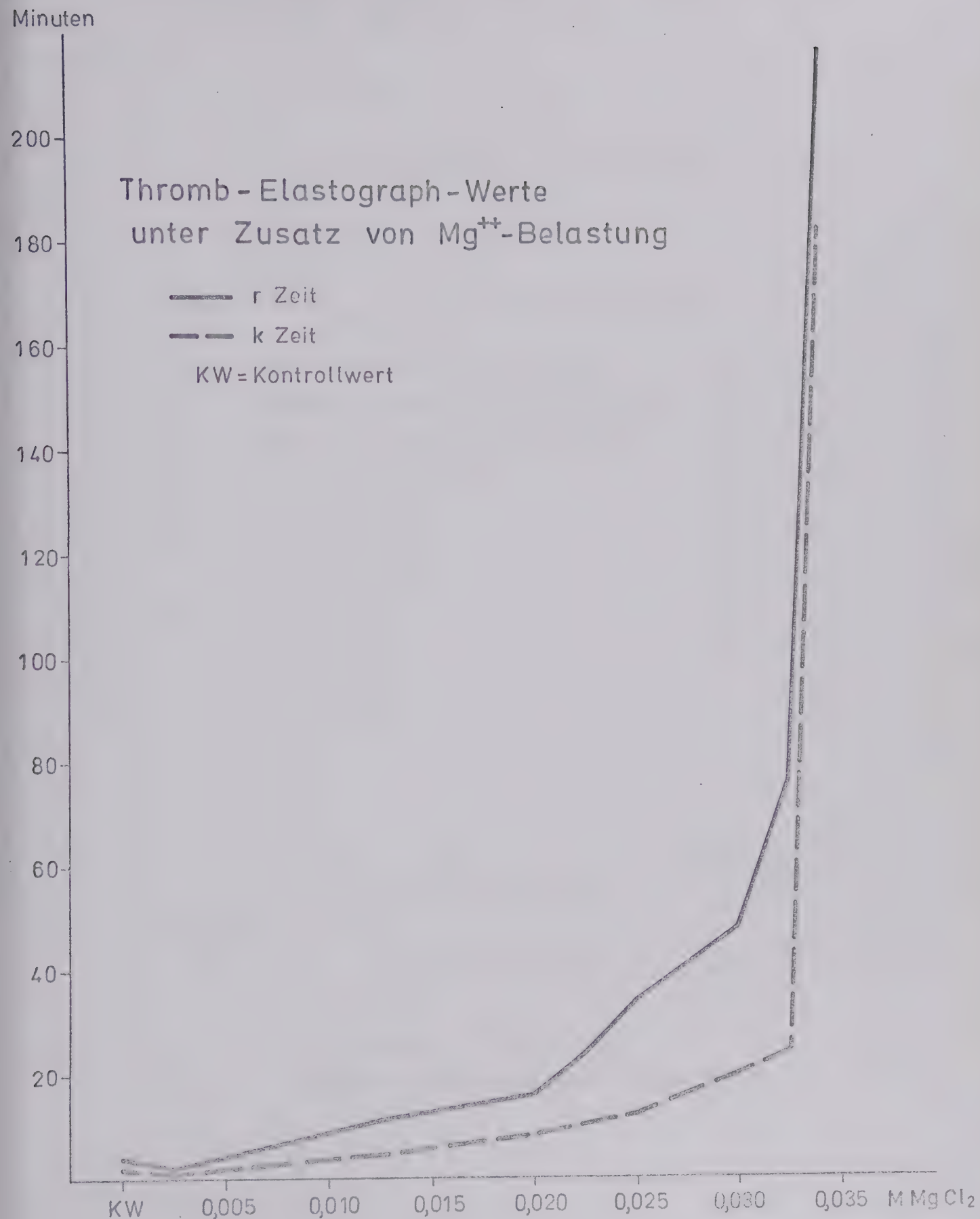
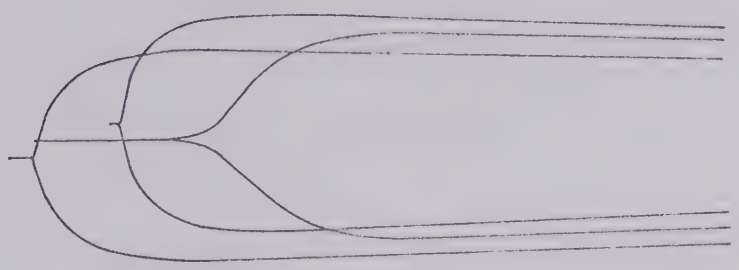

Minuten
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
Thromb-Elastograph-Werte
unter Zusatz von Mg++-Belastung
r Zeit
k Zeit
KW = Kontrollwert
KW
0,005
0,010
0,015
0,020
0,025
0,030
0,035
M Mg Cl2

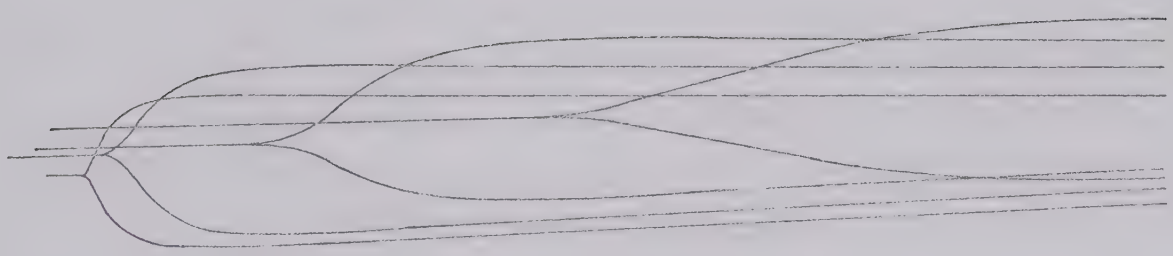
Abb. 2

Die Veränderung der r- und k-Zeit unter Zusatz von verschiedenen Mg^{++}-Konzentrationen im TEG



untere Kurve : Kontrollwert
mittlere Kurve: 0,0225 M $MgCl_2$
obere Kurve : 0,0025 M $MgCl_2$

Abb. 3



untere Kurve : Kontrollwert
folgende Kurven : 0,02 ; 0,025 ; 0,0325 M $MgCl_2$

I b) Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von ATP

Als nächstes wurde die Wirkung von ATP auf den Gerinnungsablauf im TEG geprüft.

1. Versuche

TEG-Ansätze:

0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,05 ml Michaelispuffer pH = 7,6; 0,028 Mol/l
0,05 ml ATP; 0,016 0,05 0,06 0,1 0,2 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 Mol/l

2. Ergebnisse

Siehe dazu Tabelle 3 und die Abbildungen 4 - 5.

Man erhält von 0,0008 - 0,0025 Mol/l ATP eine Verkürzung der r- und k-Zeit und eine Erhöhung der maximalen Elastizität des Gerinnsels.
Die Verkürzungen der r- und k-Zeiten liegen bei Normalplasmen gering, aber nicht signifikant unter den Kontrollwerten ohne ATP-Zusatz. Signifikante Verkürzungen der r- und k-Zeiten ergeben sich dagegen bei gealterten Plasmen, die über 36 Std. bei 5°C gelagert wurden. Bei Erhöhung der ATP-Konzentration über 0,0025 Mol/l tritt eine zunehmende Verlängerung der r- und k-Zeiten und bei 0,01 Mol/l eine deutliche Abnahme der maximalen Elastizität auf.

3. Besprechung der Ergebnisse

Die gerinnungsaktivierende Wirkung von 0,0008 - 0,0025 Mol/l ist vermutlich bedingt durch den schnellen Abbau von ATP zu ADP durch die im Plasma vorhandenen ATPasen, da das entstehende ADP die visköse Metamorphose der Blutplättchen fördert.
Die Gerinnungshemmung bei höheren ATP-Konzentrationen ist dagegen wohl vorwiegend auf eine Komplexierung des überschüssigen ATP mit den im Plasma vorliegenden zweiwertigen Kationen zurückzuführen. Die maximale Elastizität wird bei ATP-Zusatz zunächst nicht verändert, das geschieht erst bei sehr hoher ATP-Zugabe. Die Ursache hierfür könnte eine Dissoziation des Thrombosthenins durch das ATP in Thrombostenin M + A sein. Das ATP hätte dann eine Weichmacherwirkung.

4. Zusammenfassung

Eine ATP-Zugabe bewirkt offenbar durch Verminderung der wirksamen Kationen-Konzentration eine Gerinnungshemmung, die sich zunächst nur in Verlängerung von r und k zeigt. Bei hohem Überschuß an ATP nimmt auch die maximale Elastizität ab.

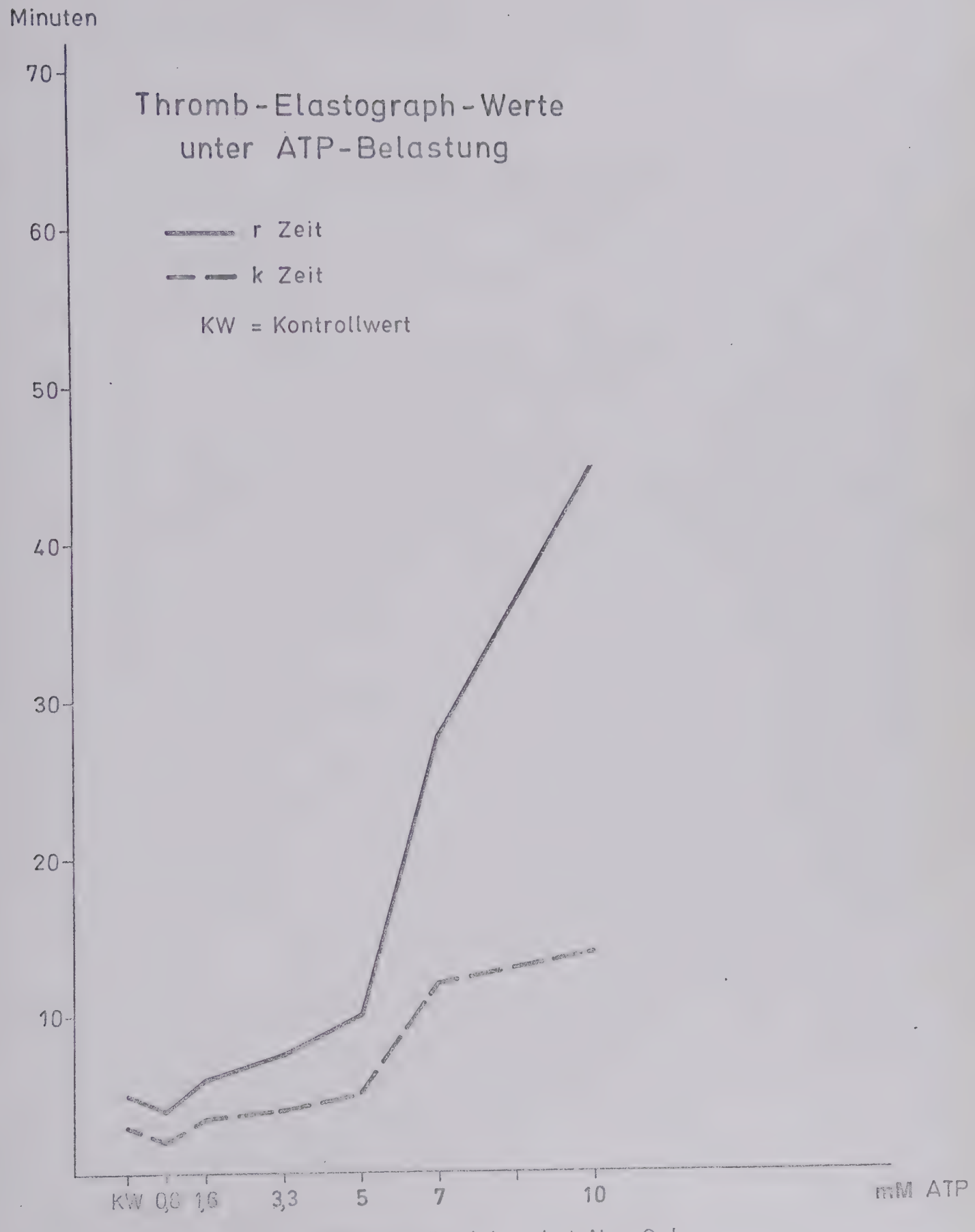
Das ATP scheint dann eine Weichmacherwirkung zu haben.

Tab. 3

Thromb - Elastograph - Werte unter ATP-Zusatz

	Kontroll-wert	0,8 mM	2,5 mM	3,3 mM	5 mM	7 mM	10 mM
r	4' 30"	3' 00"		7' 00"		30' 00"	
k	2' 15"	1' 45"		2' 30"		12' 00"	
r + k	6' 45"	4' 45"		9' 30"		42' 00"	
ma	65	66		65		58	
mε	185	194		185		138	
r	7' 30"	6' 00"		10' 30"		27' 00"	
k	3' 30"	2' 00"		4' 00"		13' 30"	
r + k	11'	8' 00"		14' 30"			
ma	55	63		62		55	
mε	122	170		163		121	
r	6' 15"	4' 30"	6' 15"		9' 00"		43' 00"
k	3' 30"	2' 30"	3' 30"		4' 00"		12' 00"
r + k	9' 45"	7' 00"	9' 45"		13' 00"		55' 00"
ma	59,5	65	60		62		37
mε	147	186	150		163		59
r	5' 30"	3' 45"	5' 45"		11' 00"		47' 00"
k	3' 15"	2' 30"	3' 30"		5' 00"		16' 00"
r + k	8' 45"	6' 15"	9' 15"		16' 00"		63' 00"
ma	58	60	60		595		40
mε	138	150	150		147		67

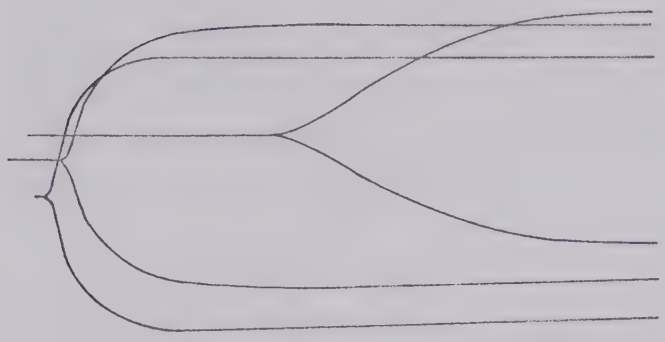
Abb. 4



ATP-Adenosin 5 triphosphat Na_2-Salz

Abb. 5

Die Veränderungen von r, k und ma im TEG unter Zusatz verschiedener ATP-Konzentrationen.



untere Kurve : $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ M ATP

mittlere Kurve: Kontrollwert

obere Kurve : 7mM ATP

I c) Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von Mg^{++} und ATP

Nachdem die Wirkung sowohl von Mg^{++} als auch von ATP allein auf den Gerinnungsablauf in vitro geprüft wurde, soll in der folgenden Versuchsreihe zu einer hemmend wirkenden Mg^{++}-Konzentration ATP hinzugegeben werden.

1. Versuche

TEG-Ansätze:

0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,025 - 0,05 ml $MgCl_2$; 0,5 Mol/l
0,05 ml ATP; 0,0008 - 0,033 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 Mol/l

2. Ergebnisse

Die Tabelle 4 und die Abbildungen 6 - 8 veranschaulichen die Ergebnisse.
Die hemmende Wirkung von Mg^{++} auf r und k von 0,015 bis 0,0325 Mol/l läßt sich durch ATP-Zusätze von 0,0008 bis 0,0016 Mol/l sehr charakteristisch vermindern und schließlich aufheben. Ein Ausgleich der Mg^{++}-Hemmwirkung wird erzielt bei einem molaren Verhältnis von 0,02 - 0,025 Mol/l $MgCl_2$: 0,0016 Mol/l ATP.

3. Besprechung der Ergebnisse

Der Ausgleich der Mg^{++}-Hemmwirkung durch ATP-Zugabe bei einem molaren Verhältnis von 0,02 - 0,025 Mol/l $MgCl_2$: 0,0016 Mol/l ATP weist auf die starke Komplexbildungsneigung von ATP mit Magnesium hin. Auffällig ist die sehr geringe ATP-Konzentration, die zur Komplexierung der überschüssigen Mg^{++} bis zur Normalisierung des Gerinnungsablaufes erforderlich ist.

4. Zusammenfassung

Die Verzögerung der r- und k-Zeit bei Zugabe hoher Mg^{++} Konzentrationen ist durch ATP-Zugabe wieder aufhebbar.

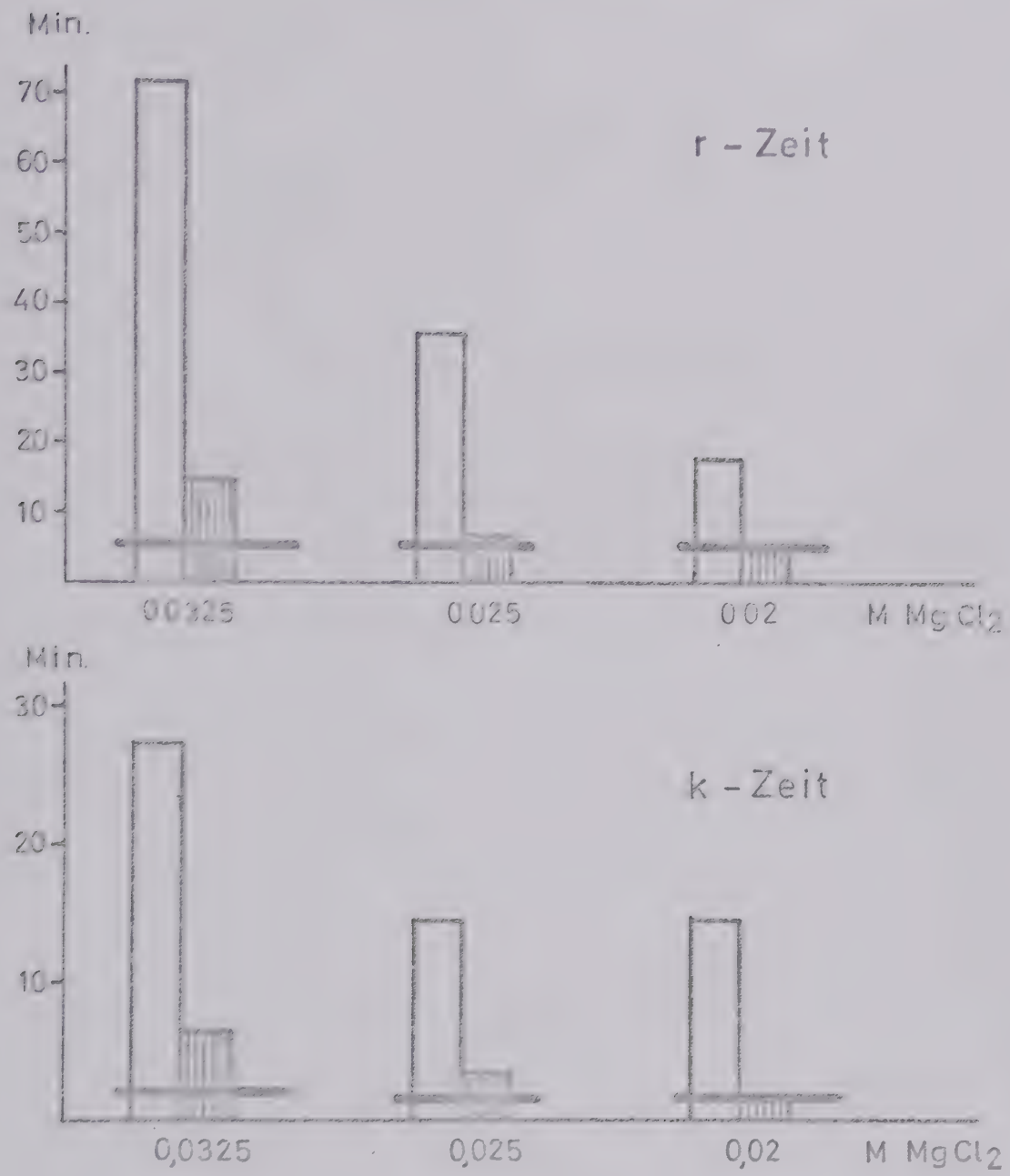
Tab. 4

Thromb-Elastograph-Werte unter Zusatz von Mg^{++} und Mg^{++} + ATP

$MgCl_2$ in M		Kontroll-werte	$MgCl_2$	$MgCl_2$ + 0,008 mM	0,032 mM	0,8 mM	1,6 mM
0,0325	r	5' 30"	71' 30"	48'	40'	32' 30"	15' 30"
	k	2'	27'	31'	24' 30"	15'	6' 30"
	r + k	7' 30"	98' 30"	79'	64' 30"	47' 30"	22'
	ma	63		60	62	62	63
	me	170		150	163	163	170
0,025	r	5' 30"	36' 30"	32' 30"		18'	7' 15"
	k	1' 30"	14' 30"	7' 30"		6' 15"	3' 30"
	r + k	7'	51'	40'		24' 15"	10' 45"
	ma	63	60	65		64	65
	me	170	150	186		178	186
0,0225	r	2'	25' 30"			15' 30"	5' 30"
	k	40"	12' 30"			6'	3' 30"
	r + k	2' 40"	38'			21' 30"	9'
	ma	79	70			71	70
	me	377	230			245	230
0,02	r	5'	18' 30"				5'
	k	1' 30"	14'				1' 30"
	r + k	6' 30"	32' 30"				6' 30"
	ma	63	63				63
	me	170	170				170
0,0125	r	5' 30"	12' 30"			5' 30"	
	k	5'	9' 30"			3'	
	r + k	10' 30"	21'			8' 30"	
	ma	45	48,5			50	
	me	82	94			100	

Abb. 6

Ausgleich des Mg^{++} Hemmefektes auf r und k im TEG durch ATP - Zusatz



Kontrollwert

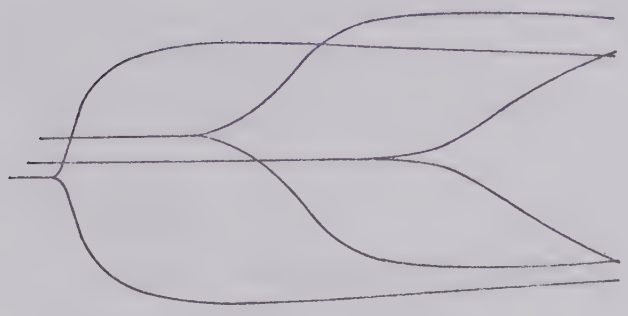
unter Belastung von :

Mg^{++}

Mg^{++} + 1,6 mM ATP

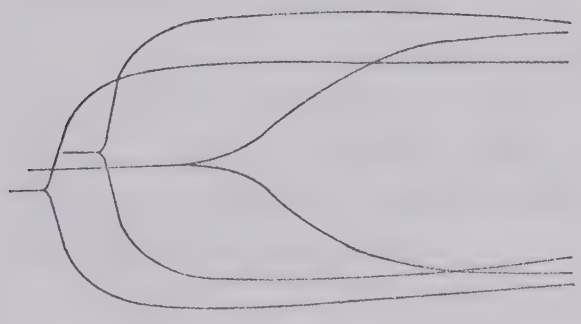
Abb. 7

Ausgleich des Mg^{++}- Hemmeffektes in bezug auf die r- und k- Zeit durch Zugabe von ATP im TEG.



untere Kurve : Kontrollwert
mittlere Kurve : 0,025 M $MgCl_2$
obere Kurve : 0,025 M $MgCl_2$ + $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ M ATP

Abb. 8



untere Kurve : Kontrollwert
mittlere Kurve : 0,02 M $MgCl_2$
obere Kurve : 0,02 M $MgCl_2$ + $0{,}16 \cdot 10^{-2}$ M ATP

I d) Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von Ca^{++}

Da die Membran-ATPase sowohl von Mg^{++} als auch von Ca^{++} beeinflußt wird, wurde der Mg^{++}-Belastung eine Ca^{++}-Belastung mit steigenden Konzentrationen gegenübergestellt.

1. Versuche

TEG-Ansätze:

0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,1 ml Michaelispuffer; pH = 7,6; 0,028 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 0,05 0,07 0,1 Mol/l

2. Ergebnisse

In Tabelle 5 und den Abbildungen 9 - 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.
Ca^{++} wirkt in gleicher Weise wie Mg^{++} mit steigender Konzentration gerinnungshemmend.
Die Erhöhung der Ca^{++}-Konzentration auf 0,05 0,066, 0,1 Mol/l führt zu Verlängerungen der r- und k-Zeit, wobei die maximale Elastizität im Normbereich bleibt oder zunimmt.
Die Zugabe von nur 0,025 Mol/l $CaCl_2$ bewirkt eine optimale Gerinnungsbeschleunigung. Noch geringere Konzentrationen verursachen wieder eine Hemmung, da dann der Citratüberschuß zu groß ist.

3. Besprechung der Ergebnisse

Die r- und k-Zeiten werden mit steigender Ca^{++}-Konzentration in ähnlicher Weise wie bei Mg^{++}-Zusätzen verlängert. Dementsprechend könnte eine analoge Beeinflussung der Membran-ATPase durch hohe Ca^{++}-Konzentrationen vermutet werden.

4. Zusammenfassung

Ein Kationenüberschuß von Mg^{++} oder Ca^{++} führt zu analogen Veränderungen von r und k im TEG.

Tab. 5

Thromb-Elastograph-Werte unter Zusatz von Ca^{++}

	Kontroll-wert 0,01	0,02	0,026	0,04 M $CaCl_2$
r	3'	8' 15"	27' 30"	48'
k	2' 45"	3'	17' 30"	31' 30"
r + k	5' 45"	11' 15"	45'	79' 30"
ma	50	62	63	64
mε	100	163	170	178
r	5' 15"	9' 30"	34'	51' 30"
k	2' 30"	4' 45"	15' 30"	29' 15"
r + k	7' 45"	14' 15"	49' 30"	80' 45"
ma	56	59	57	54
mε	127	144	133	117
r	6'	7' 45"	32' 30"	48'
k	1' 30"	3' 45"	16' 15"	31'
r + k	7' 30"	11' 30"	48' 45"	79'
ma	60	63	63	64
mε	150	170	170	178

Abb. 9

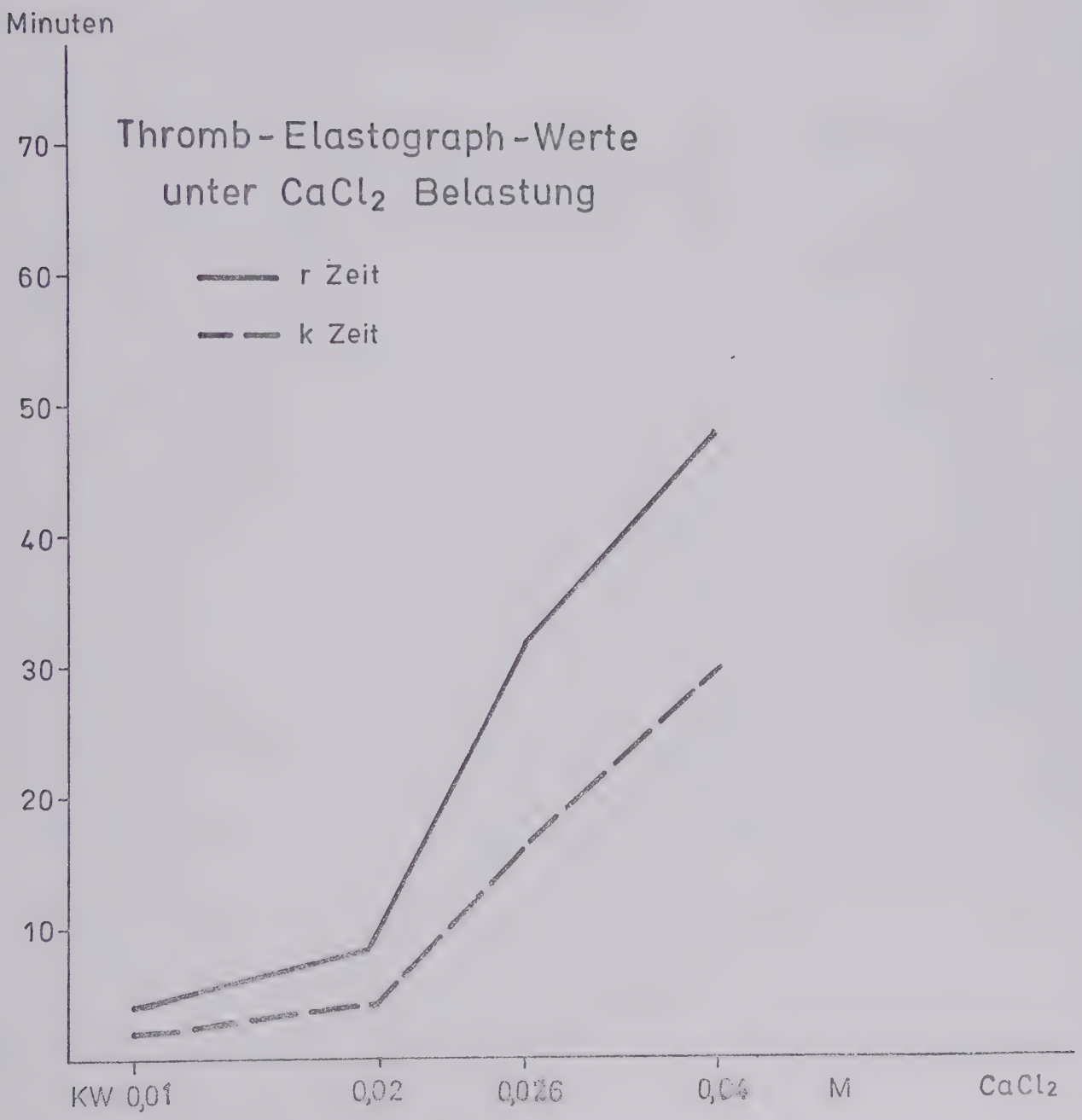
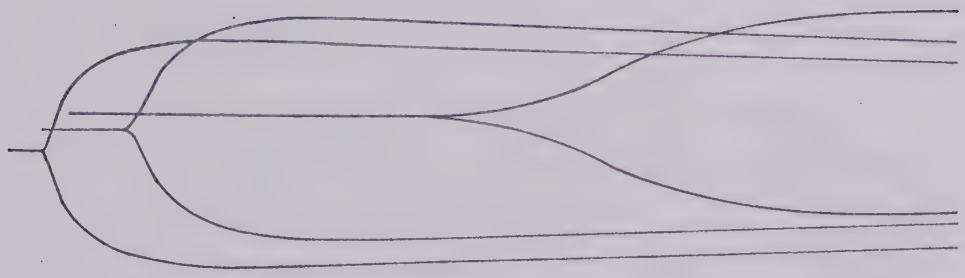

Minuten
Thromb-Elastograph-Werte
unter CaCl2 Belastung
r Zeit
k Zeit
70
60
50
40
30
20
10
KW 0,01
0,02
0,026
0,04
M
CaCl2

Abb. 10

Die Veränderung der r- und k-Zeit unter Zusatz verschiedener Ca^{++}-Konz. im. TEG.



untere Kurve : 0,01 M $CaCl_2$ = Kontrollwert
mittlere Kurve : 0,02 M $CaCl_2$
obere Kurve : 0,04 M $CaCl_2$

I e) Der Gerinnungsablauf im TEG unter Zusatz von Ca^{++} und ATP

In dieser Versuchsserie soll geprüft werden, ob die gerinnungshemmende Wirkung höherer Ca^{++}-Konzentrationen ebenso durch ATP-Zusätze aufgehoben wird, wie dies für Mg^{++} oben dargestellt wurde.

1. Versuche

TEG-Ansätze:

0,5 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
0,05 ml Michaelispuffer pH = 7,6; 0,028 Mol/l
0,05 ml ATP; 0,033 Mol/l
0,4 ml $CaCl_2$; 0,025 0,05 0,066 0,1 Mol/l

2. Ergebnisse

Wie aus Tabelle 6 und Abbildung 11 ersichtlich, läßt sich die Verzögerung der r- und k-Zeit unter einer erhöhten Ca^{++}-Konzentration durch Zugabe von ATP nahezu aufheben. Der Ausgleich erfolgt bei einem Verhältnis von 0,025 Mol/l $CaCl_2$: 0,0016 Mol/l ATP. Dieses Verhältnis wurde auch für den Ausgleich der Mg^{++}-Hemmwirkung gefunden.

3. Besprechung der Ergebnisse

Nach Komplexierung des überschüssigen Ca^{++} durch ATP ist die Kationenerhöhung offenbar soweit kompensiert, daß ein normaler Gerinnungsablauf stattfindet.

4. Zusammenfassung

Die Verzögerung von r und k bei Ca^{++}-Überschuß wird durch ATP-Zugabe verringert bis aufgehoben.

Tab. 6

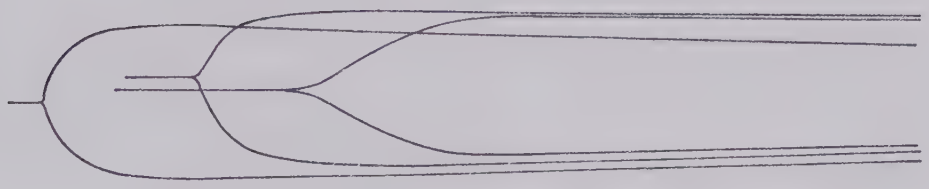
Thromb-Elastograph-Werte unter Zusatz von Ca^{++} + ATP

$CaCl_2$ in M		Kontroll-werte	$CaCl_2$	$CaCl_2$ + 1,6 mM ATP
0,02	r	5' 15"	8' 00"	5' 45"
	k	2' 30"	6' 00"	2' 30"
	r + k	7' 45"	14' 00"	8' 15"
	ma	56	54	63
	mε	127	117	166
0,02$\bar{6}$	r		34'	10' 30"
	k		15' 30"	4' 00"
	r + k		49' 30"	14' 30"
	ma		57	60
	mε		133	163
0,04	r		47'	20' 00"
	k		29' 30"	13' 00"
	r + k		76' 30"	39' 00"
	ma		57	60
	mε		133	150

AUSGLEICH DES Ca^{++}- HEMMEFFEKTES AUF r UND k IM TEG BEI ZUGABE VON ATP.

Abb. 11

Ausgleich des Ca^{++}-Hemmeffektes in bezug auf die r- und k-Zeit durch Zugabe von ATP im TEG.



untere Kurve : Kontrollwert

mittlere Kurve : 0,026 M $CaCl_2$

obere Kurve : : 0,026 M $CaCl_2$ + 0,16 · 10^{-2} M ATP

II PTT-Bestimmungen unter Zusatz von Mg^{++}, Ca^{++} sowie Mg^{++} und Ca^{++}

Zur Frage des für die Gerinnung diskutierten Ca^{++}-/ Mg^{++}-Antagonismus infolge Verdrängung von Calcium durch Magnesium wurden PTT-Bestimmungen vorgenommen, um dieses Problem unter konstanter Thromboplastinwirkung zu untersuchen.

1. Versuche

a) PTT-Bestimmungen unter Zusatz von Mg^{++}

0,1 ml Citratplasma, 20 min zentrifugiert bei 3000 U/min
0,1 ml Trispuffer; pH = 7,4; 0,05 Mol/l
0,1 ml Tachostyptest 1: 50
0,1 ml $MgCl_2$ 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 Mol/l

b) PTT-Bestimmungen unter Zusatz von Ca^{++}

0,1 ml Citratplasma
0,1 ml Trispuffer pH = 7,4; 0,05 Mol/l
0,1 ml Tachostyptest 1 : 50
0,1 ml $CaCl_2$; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 Mol/l

c) PTT-Bestimmungen unter Zusatz von Ca^{++} und 0,025 Mol/l $MgCl_2$

0,1 ml Citratplasma
0,1 ml $MgCl_2$; 0,025 Mol/l
0,1 ml $CaCl_2$; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 Mol/l
0,1 ml Tachostyptest 1 : 50

2. Ergebnisse

Aus der Tabelle 7 und der Abbildung 12 sind folgende Resultate ersichtlich:

a) Die PTT-Bestimmung nach Mg^{++}-Zusatz in Abwesenheit von Ca^{++} ist möglich. Die Zeiten sind dabei wesentlich länger als die mit Ca^{++}.
Das Mg^{++}-Optimum liegt bei 0,025 Mol/l. Geringere Mg^{++}-Konzentrationen sowie Konzentrationen über 0,025 Mol/l führen zu verlängerten Gerinnungszeiten.

b) Bei der PTT-Bestimmung in Gegenwart von Ca^{++} liegt die optimale Ca^{++}-Konzentration ebenfalls bei 0,025 Mol/l. Mit zunehmender und abnehmender Ca^{++}-Konzentration erhält man eine verlängerte Gerinnungszeit.

c) Die PTT-Bestimmung bei steigender Ca^{++} und konstanter Mg^{++}-Konzentration ergibt eine Verkürzung der PTT bei Ca^{++}-Konzentrationen, die in Abwesenheit von Mg^{++} stärker gerinnungshemmend (PTT verlängernd) wirken.

3. Besprechung der Ergebnisse

Aus den PTT-Bestimmungen folgt, daß die hemmende Wirkung eines Ca^{++}-Überschusses durch Zufügung von Mg^{++} teilweise zurückzudrängen ist.
In den TEG-Bestimmungen (Kap. I a) wurden bei Mg^{++} - Zusätzen, die zu einer teilweisen Kompensation des Citratüberschusses führten, Verkürzungen von r und k festgestellt. Ob diese Gerinnungsbeschleunigung auf einer Verbesserung der Thrombozytenfunktion oder auf einer plasmatischen Wirkung beruht, konnte aufgrund der Versuchsanordnung nicht entschieden werden. Nach den PTT-Bestimmungen erscheint für den plasmatischen Gerinnungsablauf ein bestimmtes Konzentrationsoptimum von Ca^{++} und Mg^{++} entscheidend zu sein. Bemerkenswerterweise zeigt Abbildung 12 eine für beide Ionen gleichsinnig verlaufende Konzentrationsabhängigkeit der PTT, wobei sich sogar Optima bei identischen Konzentrationen von jeweils 0,025 Mol/l Ca^{++} bzw. Mg^{++} ergeben. Insgesamt vermag Ca^{++} die Gerinnung besser zu aktivieren. Ein genereller Ca^{++}/Mg^{++}-Antagonismus kann aber nicht bestehen. Das geht auch daraus hervor, daß in Gegenwart von 0,025 Mol/l Mg^{++} und 0,025 Mol/l Ca^{++} annähernd dieselbe optimale PTT erreicht wird, wie in Gegenwart von Ca^{++} allein.

4. Zusammenfassung

Die Gerinnung wird sowohl durch Ca^{++} als auch, wenngleich etwas weniger, durch Mg^{++} aktiviert. Das Konzentrationsoptimum liegt für beide Ionen bei 0,025 Mol/l.

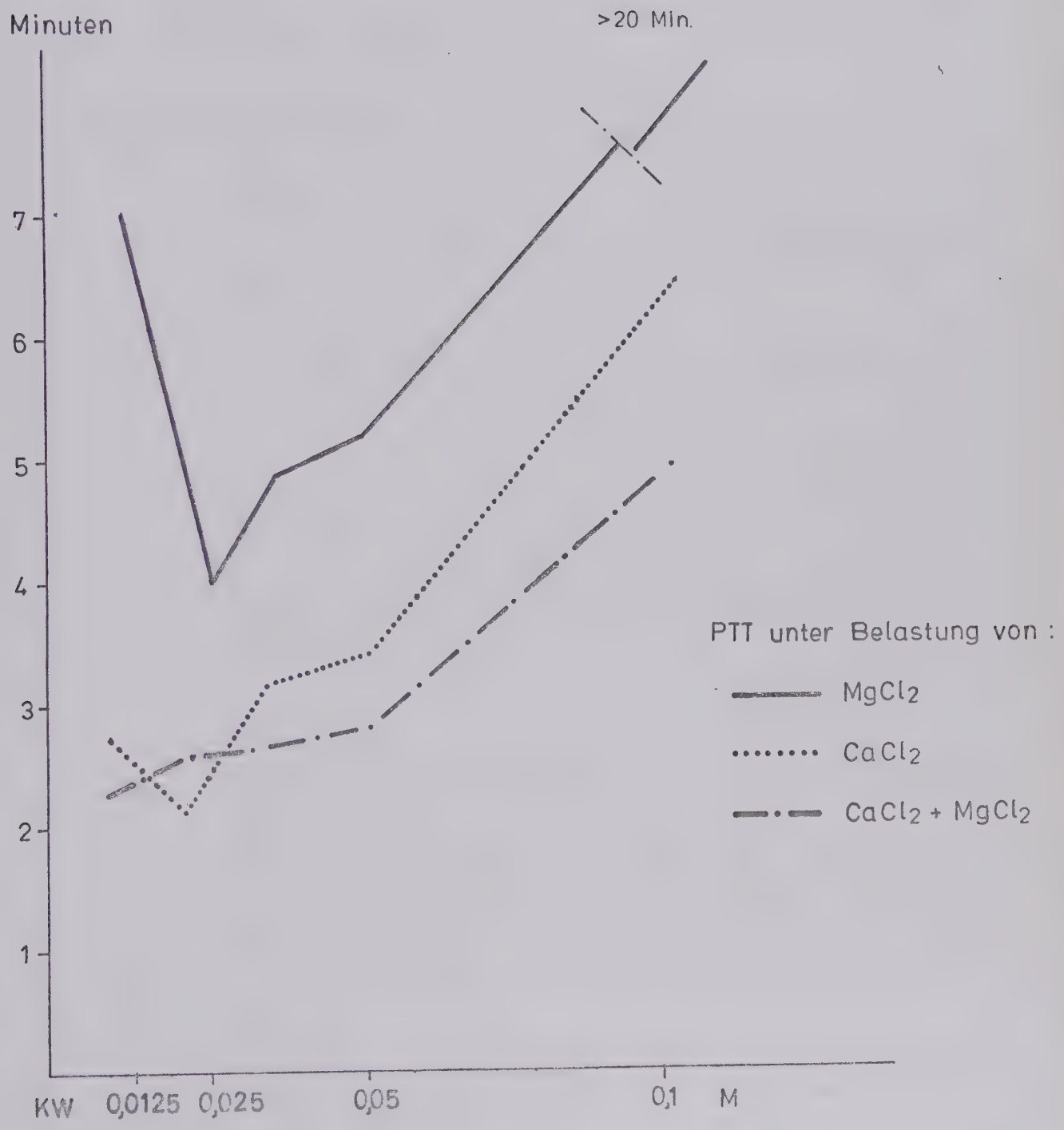
Tab. 7

PTT unter Zusatz von Mg^{++} in Abwesenheit von Ca^{++}					
Kontroll-wert	0,1	0,05	0,033	0,025	0,0125 M Mg^{++}
2' 10"	über 20'	5' 10"	4' 45"	4'	7'

PTT unter Zusatz von Ca^{++} in Abwesenheit von Mg^{++}					
Kontroll-wert	0,1	0,05	0,033	0,025	0,0125 M Ca^{++}
2' 10"	6' 24"	3' 20"	3' 05"	2' 10"	2' 40"

PTT unter Zusatz von Ca^{++} bei 0,025 M Mg^{++}					
Kontroll-wert	0,1	0,05	0,033	0,025	0,0125 M Ca^{++}
2' 10"	4' 56"	2' 45"	2' 35"	2' 27"	2' 25"

Abb. 12


Minuten
>20 Min.
7
6
5
4
3
2
1
KW
0,0125
0,025
0,05
0,1
M
PTT unter Belastung von :
MgCl2
CaCl2
CaCl2 + MgCl2

III Thrombozytenausbreitung und -aggregation

Thrombozytenausbreitung und -aggregation werden sowohl nach Zusatz von Mg^{++} allein als auch von Mg^{++} und ATP geprüft, da diese beiden Tests spezielle Aussagen über die Funktion und den Energiestoffwechsel der Thrombozyten erlauben.
Es soll mit dieser Versuchsserie untersucht werden, ob die im TEG gefundenen Veränderungen von r und k bei Mg^{++}- bzw. Mg^{++} und ATP-Belastung durch eine Hemmung der Thrombozytenfunktion verursacht werden.

IIIa) Thrombozytenausbreitung unter Zusatz von Mg^{++}

1. Versuche

Die Untersuchungsreihe wurde an 20 Normalplasmen mit Thrombozytenzahlen von 180 000 - 300 000 /mm^3 durchgeführt.

Kontrollansatz: 0,2 ml spontan sedimentiertes Citratplasma
1,8 ml Trispuffer pH = 7,4; 0,05 Mol/l

In der Mg^{++}-Belastungsreihe wurde der Trispuffer ersetzt durch 0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 Mol/l $MgCl_2$.
Es wurden jeweils 1 000 Thrombozyten pro Präparat ausgezählt. Aus Tabelle 8 geht hervor, welche Formen unterschieden wurden.

2. Ergebnisse

Tabelle 8 und die Abbildungen 13 - 17 veranschaulichen die Ergebnisse.
Man erhält bei 0,0054 - 0,011 Mol/l Mg^{++} eine maximale Ausbreitung mit Zunahme der ausgebreiteten Formen und eine Vergrößerung des Thrombozytendurchmessers. Es tritt in gewissem Sinne eine Linksverschiebung auf (BREDDIN, 1968).
Bei 0,0225 - 0,09 Mol/l Mg^{++} wird die Ausbreitung gehemmt. Die Zahl der ausgebreiteten Formen nimmt ab, während vermehrt Übergangsformen, Spinnen und Rundformen zu finden sind. Es kommt zu einer Rechtsverschiebung (BREDDING 1968) im Ausbreitungsbild.

3. Besprechung der Ergebnisse

Mg^{++} wirkt in Abhängigkeit von der Konzentration aktivierend oder hemmend auf die Ausbreitung.
In der optimalen Aktivierungskonzentration von 0,0054 - 0,011 Mol/l führt Mg^{++} offenbar zu einer Verbesserung des Thrombozytenstoffwechsels, denn es kommt zu einer erhöhten Ausbreitungsrate sowie einer Zunahme des Thrombozytendurchmessers, während weiter steigende Mg^{++}-Zusätze zu einer zunehmenden Funktionshemmung der Thrombozyten führen, bis schließlich nur noch Rundformen vorliegen. Diese Plättchenformen müssen inaktiv sein, denn im TEG kommt es zu keiner Gerinnselbildung mehr.
Die konzentrationsabhängige Aktivierung und Hemmung der Ausbreitung durch Mg^{++} läßt eine Beeinflussung von Enzymsystemen vermuten.
Es ist bekannt, daß Mg^{++} sowohl für die Glykolyse und den oxydativen Stoffwechsel als auch für die Membran-ATPase eine Rolle spielt. Die Membran-ATPase dient unter ATP-Verbrauch der Aufrechterhaltung des intrazellulären Elektrolytgradienten und damit indirekt der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels.

4. Zusammenfassung

Mg^{++} aktiviert die im Ausbreitungstest nach BREDDIN gemessene Thrombozytenfunktion mit einem scharfen Optimum bei 0,011 Mol/l. Geringere Konzentrationen beeinflussen die Ausbreitung wenig, höhere hemmen zunehmend.

Tab. 8

Thrombocytenausbreitung unter Zusatz von Mg^{++}

	Kontroll-wert	0,09 M	0,045 M	0,011 M	0,0054 M Mg^{++}
ausgebreitete Formen	74 %	5 %	30 %	85 %	78 %
Riesen-Formen				2 %	1 %
Spinnen	14 %	40 %	50 %	6 %	10 %
Aggregation	1 %			1 %	1 %
∅ ausgebreitete Formen	11 %	55 %	20 %	6 %	10 %

Mittelwerte aus 20 Bestimmungen
Die Streuung betrug maximal 6 %

Abb. 13

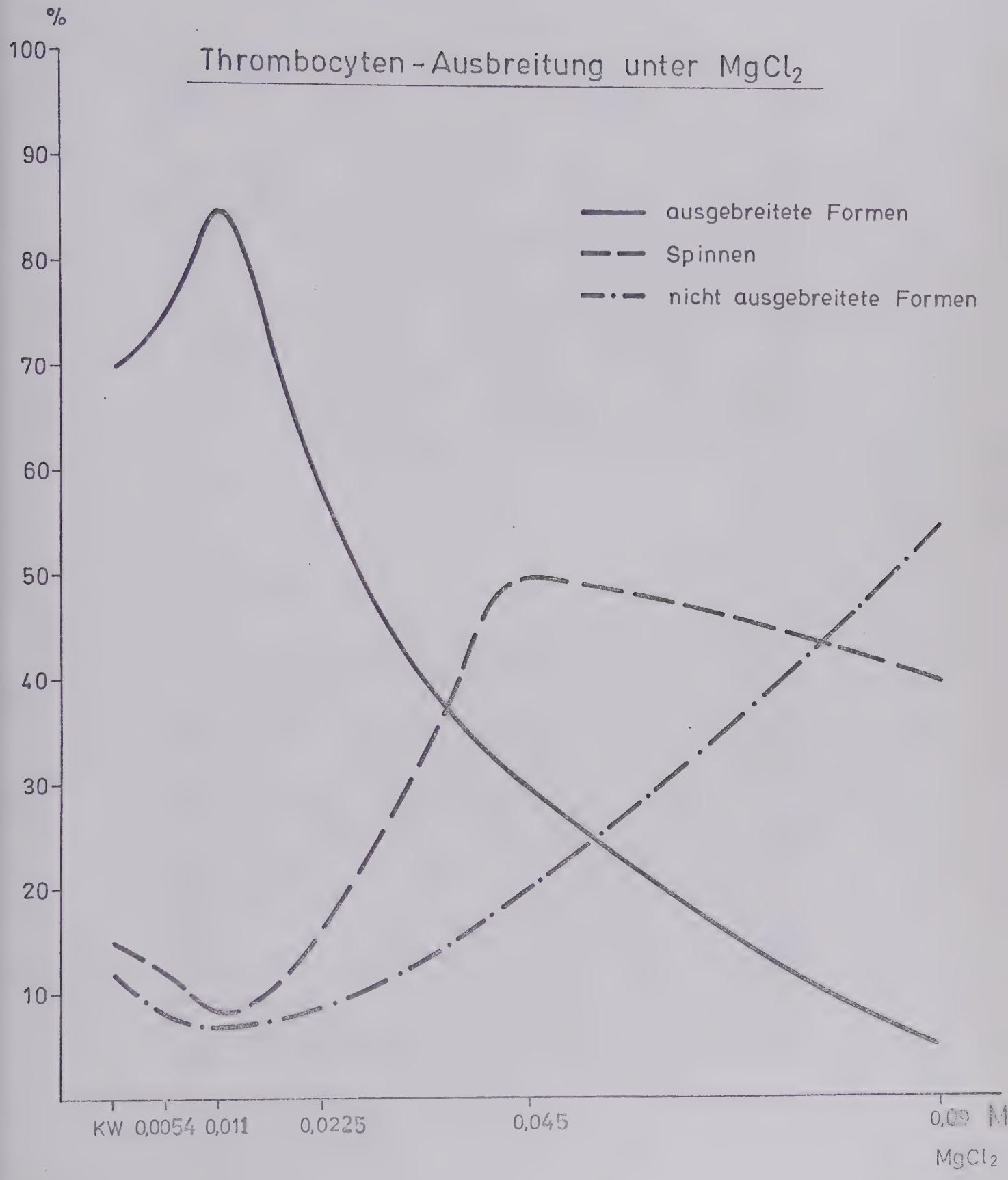
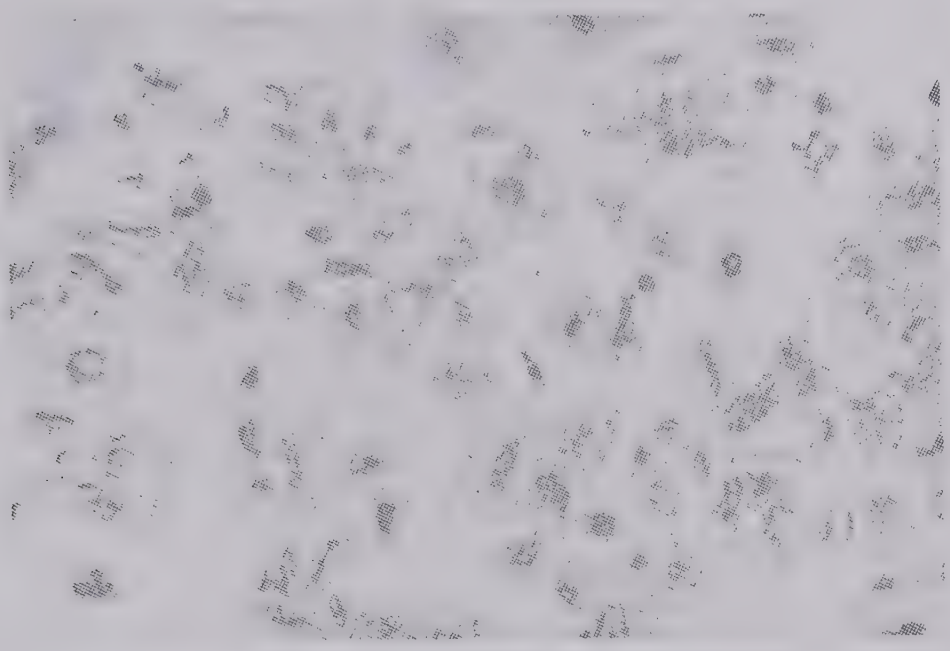

%
Thrombocyten - Ausbreitung unter $MgCl_2$
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ausgebreitete Formen
Spinnen
nicht ausgebreitete Formen
KW 0,0054 0,011 0,0225 0,045 0,09 M
$MgCl_2$

Abb. 14

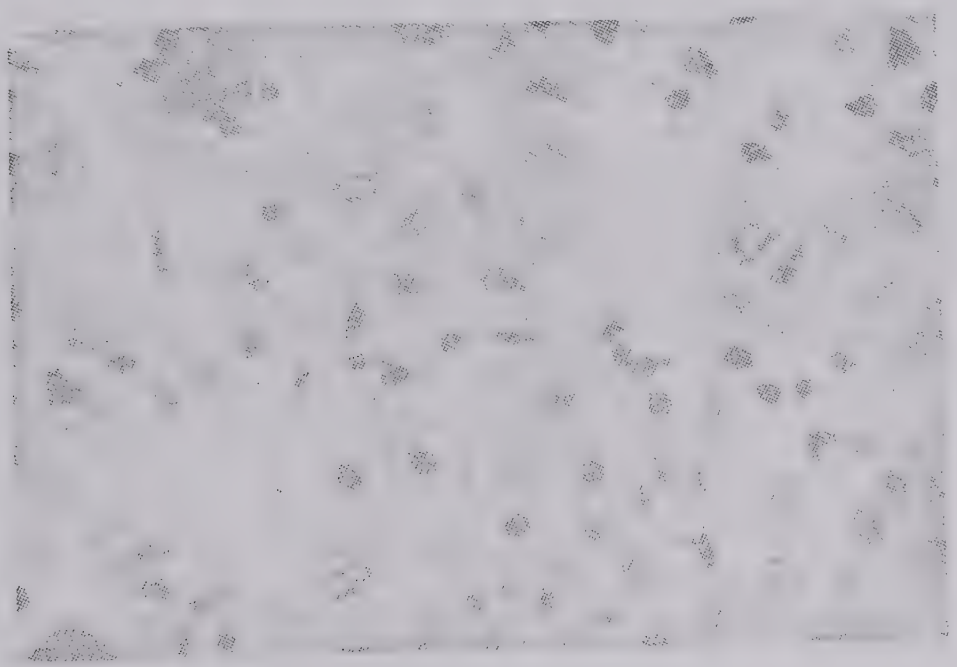
Thrombozytenausbreitung ohne Zusatz von Mg^{++}



Kontrolle

Abb. 15

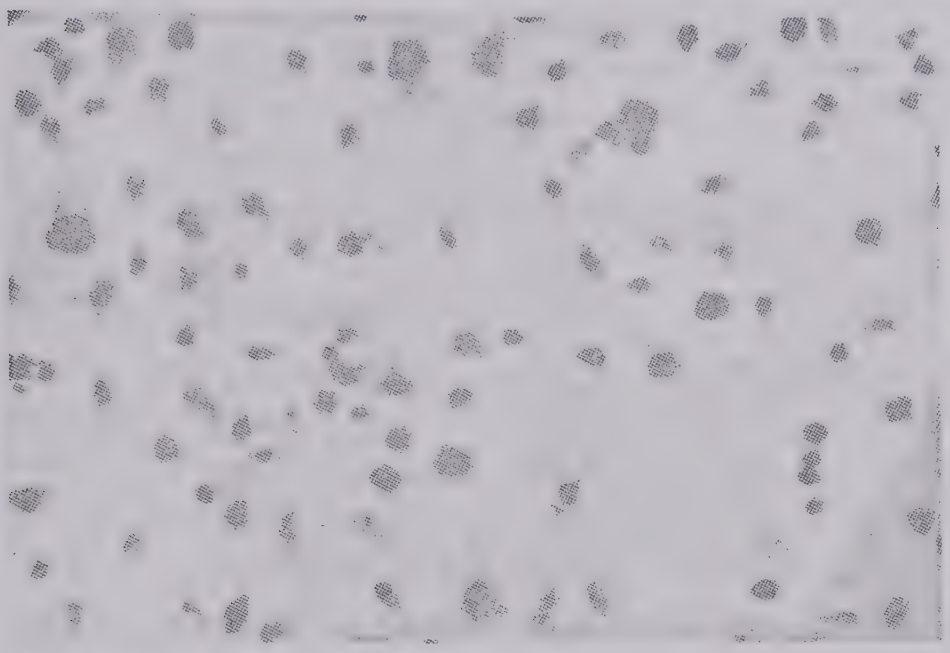
Thrombozytenausbreitung bei Zusatz von 0,011 Mol/l Mg^{++}



Steigerung der Zahl an ausgebreiteten Plättchenformen und Zunahme von großen Plättchen

Abb. 16

Thrombozytenausbreitung bei Zusatz von 0,045 Mol/l Mg^{++}

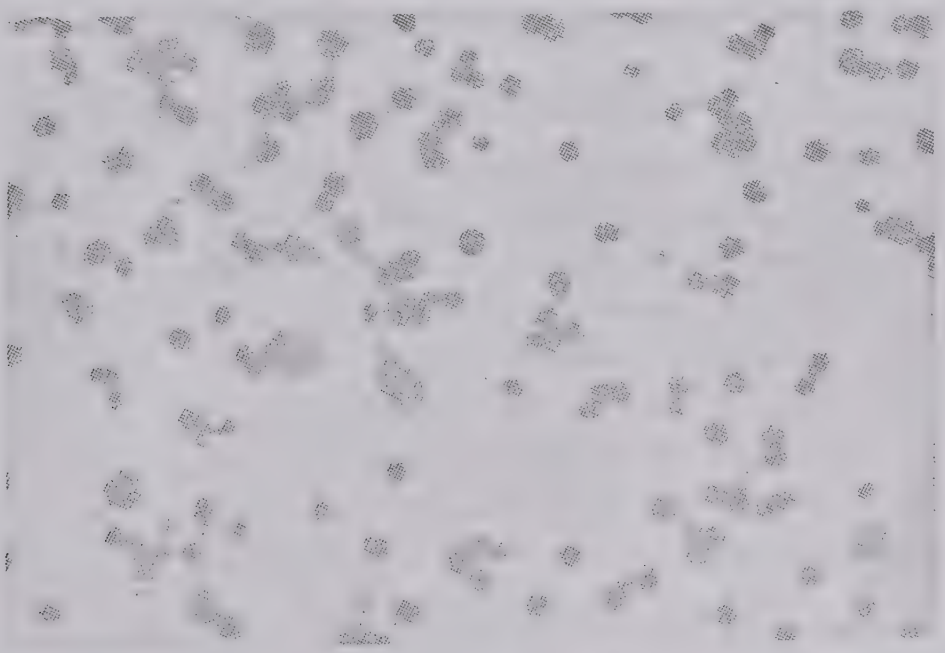


Abnahme der ausgebreiteten Plättchen

Zunahme der Spinnenformen

Abb. 17

Thrombozytenausbreitung bei Zusatz von 0,09 Mol/l Mg^{++}



Starke Abnahme der ausgebreiteten Plättchen

Überwiegen der Spinnen und Rundformen

III b) Thrombozytenaggregation unter Zusatz von Mg^{++}

1. Versuche

Kontrollansatz: 0,2 ml spontan sedimentiertes Plasma
1,8 ml Trispuffer pH = 7,4; 0,05 Mol/l

In der Mg^{++}-Belastungsreihe wurde der Trispuffer durch 0,006, 0,0125, 0,05, 0,1 Mol/l $MgCl_2$ ersetzt.

Die Rotationsdauer betrug 1 min bei 30 U/min.

2. Ergebnisse

Die Abbildungen 18 - 22 veranschaulichen die Ergebnisse.

Man erhält bei 0,0054 - 0,011 Mol/l Mg^{++} die Aggregationsstufe 2. Es ist eine Zunahme der reversiblen Aggregate ohne wesentliche Verminderung der einzeln liegenden Plättchen zu beobachten; irreversible Aggregate sind selten.

Bei den Konzentrationen 0,0225 - 0,09 Mol/l Mg^{++} findet man Aggregationsbilder, die völlig mit den Ausbreitungsbildern desselben Konzentrationsbereiches übereinstimmen. Es liegen vereinzelt ausgebreitete Formen neben überwiegend nicht ausgebreiteten Plättchen.

3. Besprechung der Ergebnisse

Geringe Mg^{++}-Zusätze bewirken weder eine Steigerung noch eine signifikante Abnahme der Aggregationsbildung. Hohe Mg^{++}-Zusätze verhindern dagegen eine Aggregationsbildung. Eine Aufquellung, Verschmelzung und Verklumpung der Plättchen findet nicht mehr statt. Folglich findet man, wie die Abb. 21 - 22 zeigen, nur vereinzelt ausgebreitete Plättchen neben vorwiegend nicht ausgebreiteten. Es werden also die für die Aggregation notwendigen Plättchenveränderungen durch hohe Mg^{++}-Konzentrationen gehemmt.

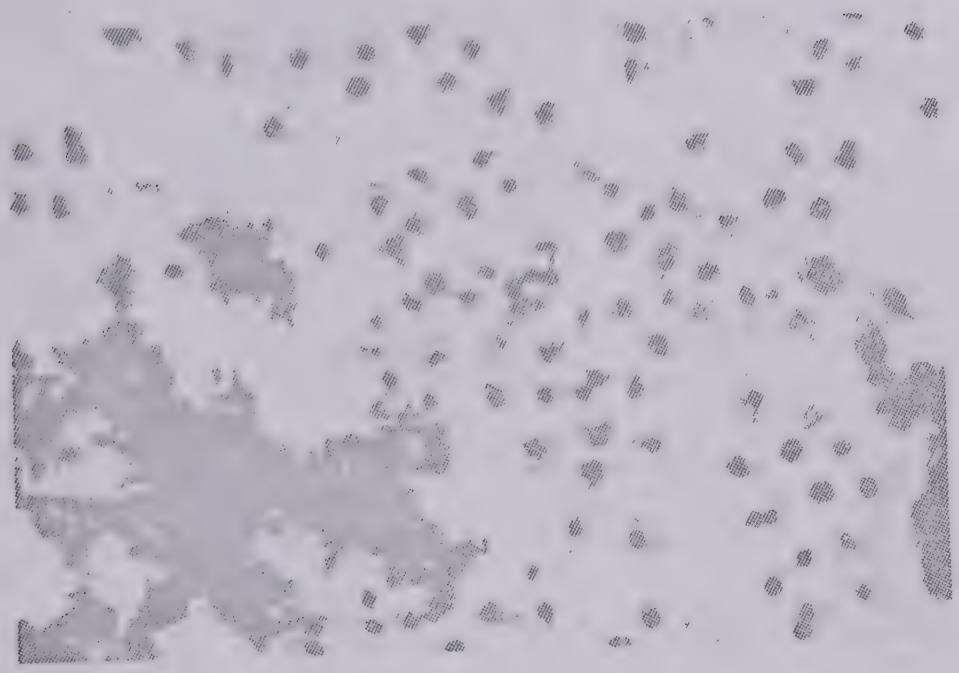
Die eigentliche Hemmwirkung von Mg^{++} im Überschuß könnte auf einer Hemmung der ADP-Freisetzung beruhen. Das ADP wird als Co-Faktor für die Aggregation benötigt.

4. Zusammenfassung

Geringe Mg^{++}-Zusätze bewirken eine Steigerung der reversiblen Aggregation bei einer Abnahme der irreversiblen Aggregationsbildung.
Steigende Mg^{++}-Konzentrationen verhindern eine Aggregationsbildung.

Abb. 18

Thrombozytenaggregation ohne Zusatz von Mg^{++}



Kontrolle

Abb. 19: 0,0054 Mol/l Mg^{++}

Zunahme der reversiblen Aggregation bei

Abnahme der irreversiblen Aggregate

Abb. 20: 0,011 Mol/l Mg^{++}

Abb. 21: 0,045 Mol/l Mg^{++}

Abb. 22: 0,09 Mol/l Mg^{++}

In Abb. 21 - 22 wird mit steigender Mg^{++}-Konzentration die Ausbreitung und Aggregation gehemmt.

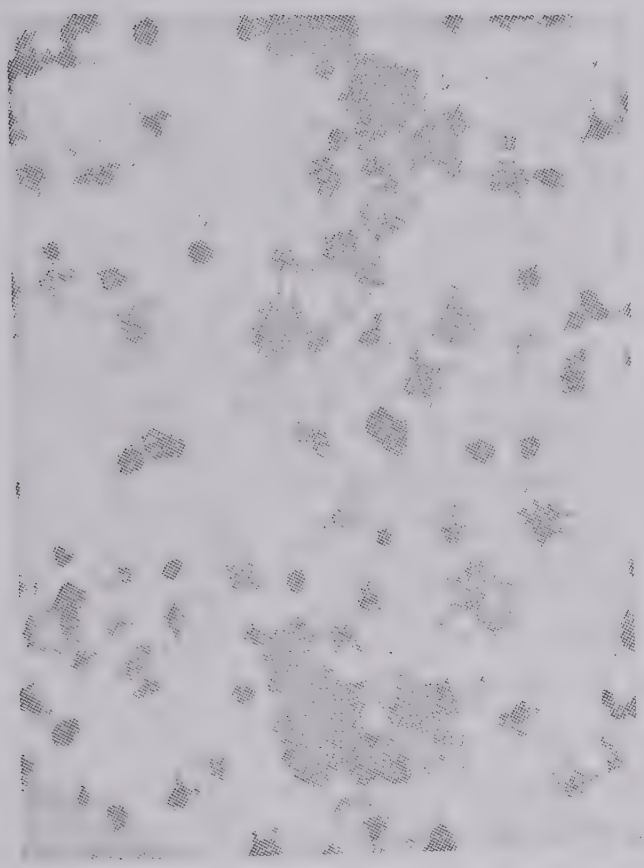


Abb. 19

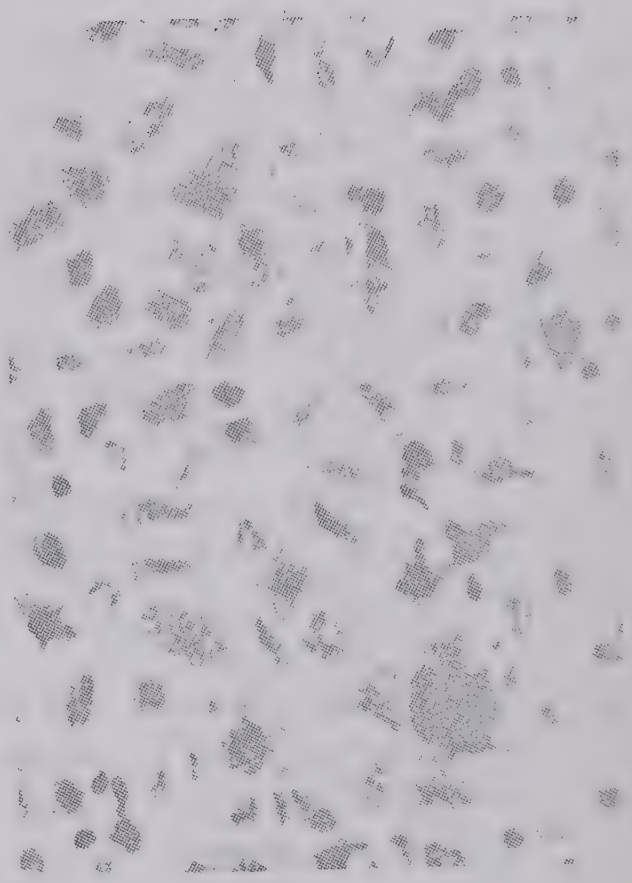


Abb. 20

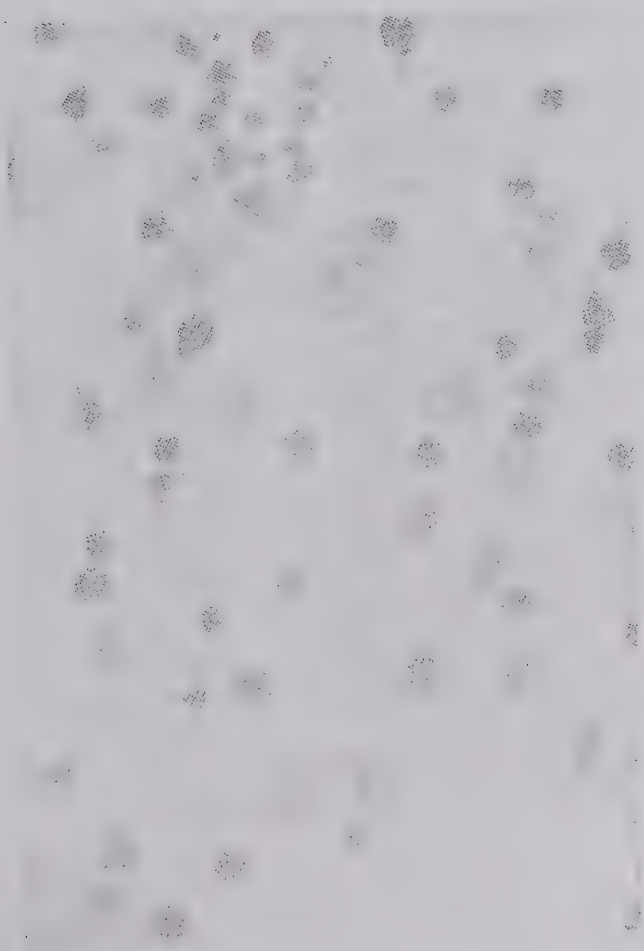


Abb. 21

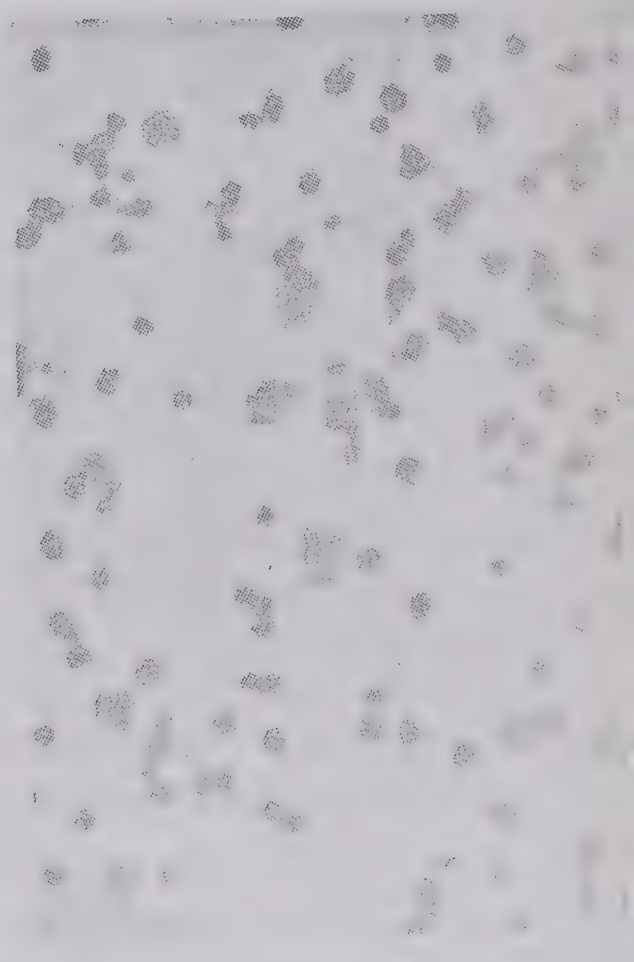


Abb. 22

III c) Thrombozytenausbreitung unter Zusatz von Mg^{++} und ATP

In dieser Versuchsserie soll geprüft werden, ob die Mg^{++}-abhängige Thrombozytenausbreitungs- und Aggregationshemmung (Kap. III d) durch ATP-Zusatz wie im TEG aufzuheben ist.

1. Versuche
Ansatz:

0,2 ml spontan sedimentiertes Plasma
0,9 ml $MgCl_2$; 0,1 Mol/l
0,9 ml ATP; 0,01 Mol/l

2. Ergebnisse

Die unter 0,045 Mol/l Mg^{++} gefundene Ausbreitungshemmung wird durch ATP-Zusatz weitgehend aufgehoben. Die bei 0,045 Mol/l Mg^{++} im Mittel gefundene Ausbreitung von 30 % erhöhte sich bis auf 65 % unter der Zugabe von 0,0045 Mol/l ATP.

III d) Die Plättchenaggregation unter Zusatz von Mg^{++} und ATP

1. Versuche
Ansatz:

0,2 ml spontan sedimentiertes Plasma
0,9 ml $MgCl_2$; 0,1 Mol/l
0,9 ml ATP; 0,01 Mol/l
(Rotationsdauer 1 min bei 30 U/min).

2. Ergebnisse

Die Aggregationshemmung durch einen Mg^{++}-Überschuß ist ebenfalls durch einen ATP-Zusatz zu verhindern. Man findet bei 0,045 Mol/l $MgCl_2$ und 0,0045 Mol/l ATP, also einem Verhältnis von 1 : 10, ein Aggregationsbild, das etwa dem Kontrollbild entspricht. Teilweise kam es zu stärkerer Aggregationsbildung.

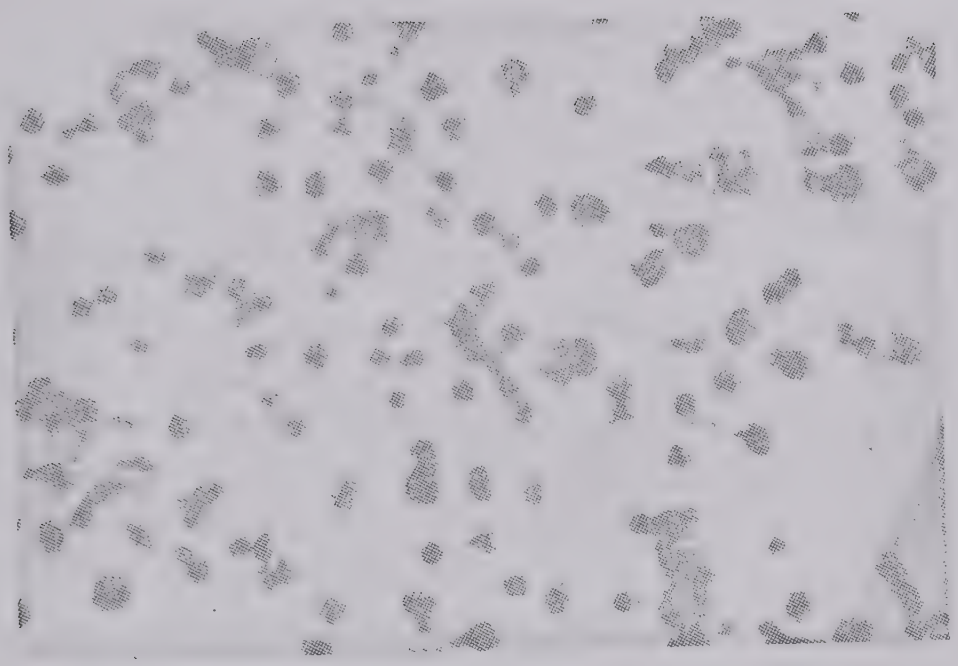
3. Besprechung der Ergebnisse

Vermutlich ist die Aufhebung der Thrombozytenfunktionshemmung auf eine Komplexierung der überschüssigen Mg^{++} durch ATP zurückzuführen.
In den TEG-Untersuchungen (Kap. I c) ergibt sich unter ähnlichen Belastungen ein normaler Gerinnungsablauf.
Aus der Parallelität der Versuchsergebnisse von Ausbreitung, Aggregation zum TEG (Kap. I a, c) läßt sich schließen, daß die r- und k-Veränderungen im TEG durch Ausbreitungs- und Aggregationsstörungen der Thrombozyten bedingt sind und diese wiederum auf einer Aktivierung bzw. Hemmung von Enzymsystemen beruhen, in denen Mg^{++} als Co-Faktor wirkt.

4. Zusammenfassung

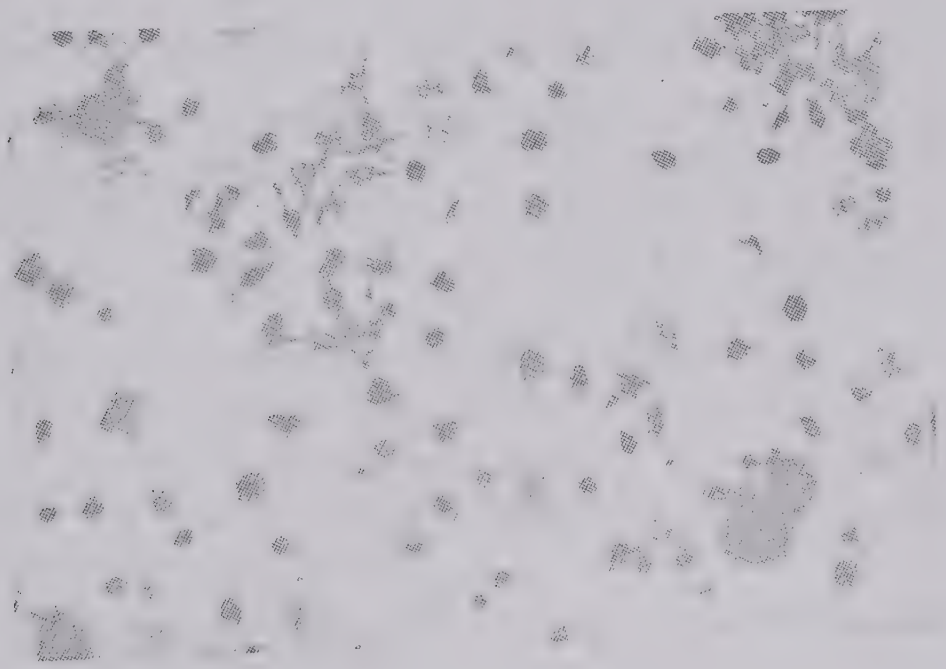
Die Thrombozytenausbreitungs- und -aggregationshemmung bei Mg^{++}-Überschuß ist durch ATP-Zugabe aufhebbar.

Abb. 23



Aggregationshemmung unter 0,045 Mol/1 $MgCl_2$

Abb. 24



Aufhebung der Aggregationshemmung durch Zugabe von 0,0045 Mol/1 ATP zu 0,045 Mol/1 Mg^{++}

D. DISKUSSION

In den vorliegenden Untersuchungen zur Rolle von Magnesium-Ionen im Gerinnungsablauf sollte geprüft werden, inwieweit diese durch eine Thrombozytenfunktionsänderung die plasmatische Gerinnung beeinflussen.

Aus klinischen und experimentellen Befunden ist bekannt, daß es durch das Fehlen bestimmter Plättchenfaktoren zu einer Störung der plasmatischen Gerinnung kommt. Diese Faktoren werden bei Beeinträchtigung des Energiepotentials der Blutplättchen freigesetzt, z.B. wenn durch Blockade der membranständigen ATPase ein intrazellulärer Kaliumverlust auftritt.

Die Funktion der membranständigen ATPase wird insbesondere durch die zweiwertigen Kationen Calcium und Magnesium mitbestimmt. Diesem Enzymsystem scheint im Haemostasemechanismus eine auslösende Bedeutung zuzukommen. Bei allen zu Adhaesion oder Aggregation führenden Prozessen findet sich eine Hemmung seiner Aktivität (GROSS, SCHNEIDER (1971)).

Aufgrund der bestehenden Abhängigkeit der Blutgerinnung von bestimmten Thrombozytenfaktoren, insbesondere Plättchenfaktor 3, könnten sich Veränderungen im Funktionszustand der Membran-ATPase auch auf den Ablauf der Globalgerinnung auswirken.

Als Parameter für die Globalgerinnung wurde das Thrombelastogramm gewählt, während der Funktionszustand der Thrombozyten anhand ihrer Ausbreitung und Aggregation beurteilt wurde.

Zur Klärung des in der Literatur diskutierten Calcium-Magnesium-Antagonismus wurden ergänzend Thrombelastogramme unter Calcium-Belastung und PTT-Bestimmungen unter Zusatz von Magnesium und Calcium allein sowie von beiden zusammen durchgeführt.

Die Untersuchungen ergeben folgende Ergebnisse:
Magnesium-Ionen-Zusatz führt im TEG bis zu einer Konzentration von 5 /uval/ml zu einer Verkürzung von r und k. Diese Verkürzung weist auf eine nicht optimale Gerinnungseinleitung durch die vorgegebenen Calcium-Ionen hin.

Die Berechnung der Ionenkonzentrationen im TEG-Kontrollansatz ergibt ein Verhältnis von 21 /uval/ml Citrat zu 20 /uval/ml Ca^{++}. Der errechnete Citratwert ist dabei eher zu niedrig veranschlagt, da bei Annahme einer Plasma-Calcium-Konzentration von 5 /uval/ml

das Gesamt-Calcium, und nicht nur die freie, nicht eiweißgebundene Fraktion, berücksichtigt wird.

Das Verhältnis Citrat zu Magnesium beträgt unter optimalen Bedingungen im TEG 1:2 - 1:5.

Auffällig ist der relativ schmale Konzentrationsbereich, in dem Magnesium-Ionen gerinnungsfördernd wirken, während steigende Konzentrationen im TEG zu einer zunehmenden Verlängerung von r und k führen (vgl. Tab. 1 - 2) bis schließlich bei 70 µval/ml Mg^{++} überhaupt keine Gerinnselbildung mehr auftritt. Bemerkenswerterweise wird die maximale Elastizität bis zu 65 µval/ml Mg^{++} nicht verändert, während die r-Zeit im Mittel 77 min und die k-Zeit 22 min betragen.

Die parallel durchgeführten Thrombozytenausbreitungen und -aggregationen zeigen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aktivierung und Hemmung. Bei geringen Magnesium-Konzentrationen erhöhte sich die Ausbreitungsrate im Mittel um 11 % (maximal 20%), daneben findet sich eine allgemeine Zunahme des Thrombozytendurchmessers. Dieselbe Magnesium-Konzentration bewirkt eine Zunahme der reversiblen Aggregation bei Abnahme der irreversiblen Aggregate.

Mit steigender Magnesium-Konzentration ist eine zunehmende Hemmung von Ausbreitung und Aggregation festzustellen, wobei es vermehrt zur Ausbildung von Übergangsformen und Spinnen kommt, bis schließlich nur noch Rundformen vorliegen. Eine Aggregatbildung tritt unter diesen Konzentrationen überhaupt nicht mehr auf. Die Durchrechnung der vorgegebenen Ionen-Konzentrationen im Ausbreitungs- und Aggregationsansatz ergibt, daß bei 8,4 µval Citrat / Ansatz und 45 µval Magnesium/Ansatz eine optimale Ausbreitung und eine Abnahme der irreversiblen Aggregate auftritt, während eine Erhöhung darüber hinaus zu einer Hemmung führt.

Mit einem Verhältnis Magnesium zu Citrat von etwa 1 :5 findet sich ein Quotient, der bemerkenswerterweise in derselben Größenordnung liegt, wie der oben für die optimale Aktivierung im TEG beschriebene.

Der Umstand, daß für die Optimierung der mittels TEG gemessenen Globalgerinnung annähernd dasselbe Verhältnis von Citrat zu Magnesium wie für die optimale Aktivierung von Thrombozytenausbrei-

tung und -aggregation gefunden wird, legt die Vermutung nahe, daß den r- und k-Veränderungen im TEG funktionelle Veränderungen der Thrombozyten zugrunde liegen. In unserer Versuchsanordnung wurde nur das morphologische Korrelat beobachtet. Die diese möglicherweise auslösenden biochemischen Vorgänge können hier nur anhand der Literatur angedeutet werden.

Da das Magnesium für die membranständigen ATPasen und als Co-Faktor im oxydativen und glykolytischen Stoffwechsel benötigt wird, ist eine Einflußnahme hierauf bei Änderung der Mg-Ionen-Konzentration anzunehmen. Welche enzymatischen Reaktionsabläufe vorherrschend aktiviert bzw. gehemmt werden, kann nicht genauer präzisiert werden.

Die Funktionsstabilisierung der Thrombozyten mit erhöhter Ausbreitungsrate sowie die Zunahme des Thrombozytendurchmessers deuten auf eine Verbesserung des Thrombozytenstoffwechselsystems bei geringen Mg-Ionen-Zusätzen hin. Die Ausbreitungs- und Aggregationshemmung könnte infolge der auftretenden Funktionshemmung der Thrombozyten auf einer zunehmenden Blockierung des Stoffwechselsystems beruhen, sowie auf einer Einflußnahme auf die Membran-ATPase, die unter ATP-Verbrauch der Aufrechterhaltung des Elektrolytgradienten dient.

Da "die Auslösung der Plättchenfunktion im Haemostasemechanismus mit Wahrscheinlichkeit zunächst durch eine Hemmung der ATPasen erfolgt und die Blockierung des intrazellulären ATP-Verbrauchs an der Membran den Zusammenbruch der intrazellulären Elektrolytkompartimentierung zur Folge hat" (SCHNEIDER 1971), ist aufgrund der gefundenen Thrombozytenveränderungen bei hohen Mg-Ionen-Konzentrationen zu überlegen, ob neben der Stoffwechselhemmung nicht gleichzeitig eine Art Stabilisierung des Thrombozyten eintritt, so daß die morphologischen Desintegrationsprozesse der viskösen Metamorphose nicht eintreten können. Dies würde beispielsweise die r- und k-Veränderungen erklären, die dann durch eine verzögerte Freigabe von Thrombozytenfaktoren bedingt wären, die für die plasmatische Gerinnung erforderlich sind.

Auffällig ist, daß die maximale Elastizität des Gerinnsels zunächst nicht verändert wird. Eine Hemmung des kontractilen Systems, das insbesondere von ATP und Calcium abhängt, scheint erst bei völliger Funktionseinbuße der Thrombozyten in der gewählten Ver-

suchsanordnung aufzutreten.

Die diskutierte Hemmung der morphologischen Desintegrationsprozesse bei erhöhter Mg-Ionen-Konzentration scheint durch Ca-Ionen-Zugabe in ähnlicher Weise vorzuliegen. Im TEG sind dieselben r- und k-Veränderungen zu finden.

Durch ATP-Zugabe sind die beschriebenen r- und k- sowie Thrombozytenform-Veränderungen reversibel.
Für die Aufhebung der hemmenden Wirkung von 0,02 - 0,025 Mol/l Mg^{++} bzw. Ca^{++} sind 0,0016 Mol/l ATP im TEG erforderlich.
Die Hemmwirkung von 0,045 Mol/l Mg^{++} auf die Thrombozytenausbreitung und -aggregation ist durch 0,0045 Mol/l ATP zu kompensieren.
Für die Kompensation der Hemmeffekte von Magnesium und Calcium durch ATP findet sich für beide Ionen ein ähnliches Konzentrationsverhältnis von etwa 1:10.

Auffällig ist die relativ geringe ATP-Konzentration, die zur Kompensation der zugegebenen Kationen ausreicht.
Bei einer vergleichsweisen Auswertung der Tabellen 2 und 4 ergibt sich, daß bei ATP-Konzentrationen ab 0,8 mMol/l die hemmende Wirkung von etwa der 10-fachen Konzentration von zweiwertigen Kationen aufgehoben wird. Dieser Effekt könnte auf eine Komplexbildung von ATP mit Magnesium bzw. Calcium zurückzuführen sein.
Die in Tab. 4 geprüften minimalen ATP-Konzentrationen von 0,008 und 0,032 mMol/l zeigen aber auch noch eine deutliche gerinnungsfördernde Wirkung, die durch die bloße Komplexierung von zweiwertigen Kationen allein nicht erklärt werden kann. Möglicherweise ist der unter diesen Bedingungen zu beobachtende gerinnungsfördernde Effekt direkt auf eine Freisetzung von ADP aus ATP zurückzuführen, das bekanntlich die viskose Metamorphose der Plättchen fördert (GAARDERS, JOHNSON, HELLEM, OWREN (1961)).

In früheren Untersuchungen wird für die Wirkungsweise von Magnesium-Ionen eine Hemmung der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch Kompetition mit Calcium diskutiert, sowie eine thrombozytenstabilisierende Wirkung und Aggregationshemmung (ZAHNERT, OLOFFS 1961).
Die von FONIE, HACKETHAL, VOELKEL, ZAHNERT und OLOFFS angenommene Aggregationshemmung kann von uns bestätigt werden. Die Wirkung von Mg-Ionen besteht aber nicht ausschließlich in einer Aggrega-

tionshemmung. Diese ist nur für hohe Konzentrationen sicher. Geringe Mg-Konzentrationen sind nach BRINKHOUS, READ, MASON (1964), DES PRES, BRYANT, KATZ und BRITTINGHAM (1967) sowie BREDDIN (1968) sogar erforderlich.

Auch nach unseren Versuchen beruhen die unterschiedlichen Wirkungen des Magnesiums als Antikoagulans auf den stark abweichenden geprüften Konzentrationen.
In In-vivo-Versuchen stellten HARTERT und SCHIMPF (1957), EGGELING (1959), THIES (1959) und WILLE (1960) keine eindeutigen wirkungsvollen Veränderungen der Vorphase und der gerinnungshemmenden Effekte durch Mg-Ionen fest, wie sie dagegen insbesondere von ZAHNERT und OLOFFS (1960) und DURLACH (1967) beschrieben wurden. Nach unseren Versuchen tritt eine effektive Gerinnungs-, Ausbreitungs- und Aggregationshemmung erst bei hohen Mg-Konzentrationen auf, die außerhalb der klinischen Anwendbarkeit liegen; damit kommt Magnesium als brauchbares Antikoagulans nicht in Betracht.

Hinsichtlich des diskutierten Calcium-Magnesium-Antagonismus ergeben unsere Untersuchungen, daß ein bestimmtes Konzentrationsoptimum von Calcium und Magnesium für den Gerinnungsablauf entscheidend zu sein scheint. Für beide Ionen ergibt sich eine gleichsinnig verlaufende Konzentrationsabhängigkeit der PTT, wobei die Optima bei identischen Konzentrationen von jeweils 0,025 Mol/l liegen.
Ein genereller Antagonismus kann nicht bestehen. Das geht auch daraus hervor, daß in Gegenwart von 0,025 Mol/l Mg^{++} und 0,025 Mol/l Ca^{++} annähernd die optimale PTT erreicht wird, wie in Gegenwart von Calcium allein, und daß bei Calcium-Konzentrationen sich die PTT durch Magnesium verkürzen läßt.
Die angenommene Hemmung der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin ist nach unseren Versuchen auf eine Thrombozytenfunktionsänderung zurückzuführen, wobei die zunehmende Hemmung der morphologischen Desintegrationsprozesse wohl eine gehemmte Freisetzung der Thrombozytenfaktoren entspricht.

Diese Hemmung beruht aber nicht auf einer Kompetition von Magnesium mit Calcium. Sie wird vielmehr durch eine Erhöhung beider Kationen gleichermaßen verursacht.
In niedrigen Konzentrationen erscheint neben Calcium auch Magnesium für einen optimalen Ablauf der Gerinnung unerläßlich.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten:
Mg-Ionen-Zusatz bewirkt bis zu 5 /uval/ml eine Verkürzung von r und k im TEG. Das Verhältnis Citrat : Magnesium beträgt dabei 1 : 5.
Die Thrombozytenfunktionsprüfungen zeigen eine optimale Ausbreitung mit erhöhter Rate sowie eine Abnahme der reversiblen Aggregationsbildung bei annähernd demselben Citrat-Magnesium-Quotienten.
Mit steigender Mg-Konzentration werden r und k zunehmend verlängert bis zur Ungerinnbarkeit des Gerinnsels bei 70 /uval/ml.
Die maximale Elastizität des Gerinnsels ändert sich bis zu 65 /uval/ml trotz stark verzögerter r- und k-Zeiten nicht.

Parallel zu den r- und k-Veränderungen im TEG findet sich mit steigender Mg-Konzentration eine Hemmung der Thrombozytenausbreitung und der Aggregation bis schließlich nur noch Spinnen und Rundformen vorliegen.

Hohe Ca-Ionen-Konzentrationen verursachen dieselben Funktionshemmungen im TEG.

Die Gerinnungs-, Ausbreitungs- und Aggregationshemmung durch hohe Mg- bzw. Ca-Konzentrationen sind durch ATP-Zusatz wieder aufzuheben. Für beide Ionen findet sich für die Kompensation der Hemmeffekte durch ATP ein ähnliches Konzentrationsverhältnis von 1:10.

Nach hohen ATP-Zugaben tritt ebenfalls eine Gerinnungshemmung mit zunehmender Abnahme der maximalen Elastizität im TEG auf.

Der in früheren Untersuchungen diskutierte Magnesium-Calcium-Antagonismus kann nicht bestätigt werden.
Die TEG-, Ausbreitungs- und Aggregationsuntersuchungen sowie die PTT-Bestimmungen zeigen, daß ein optimaler Gerinnungsablauf sogar erst bei Anwesenheit von Mg-Ionen in niedrigen Konzentrationen erreicht wird.

Schließlich ergaben die Untersuchungen, daß Magnesium als brauchbares Antikoagulans nicht in Betracht kommt, da eine effektive Gerinnungshemmung erst bei physiologisch unvertretbar hohen Konzentrationen auftritt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. BETTEX-GALLAND,M., LÜSCHER,E.F. : Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombocytes. Nature (Lond.) 184 (1959): 276-277

2. BETTEX-GALLAND,M., LÜSCHER,E.F. : Studies on the metabolism of human blood platelets in relation to clot retraction. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 4 (1960): 178-183

3. BETTEX-GALLAND,M., LÜSCHER,E.F. : Thrombosthenin - a contractile protein from thrombocytes. Its extraction from human blood platelets and some of its properties. Biochi.biophys.Acta (Amst.) 49 (1961 b): 536-547

4. BETTEX-GALLAND,M., PORTZEHL,H., LÜSCHER,E.F. : Dissociation of thrombosthenin into two components comparable with actin and myosin. Nature (Lond.) 193 (1962): 777-778

5. BETTEX-GALLAND,M., LÜSCHER,E.F. : Der Thrombocyt. Lehmann (München) 1969

6. BORN,G.V.R. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature (Lond.) 194 (1962): 297-298

7. BORN,G.V.R. : Uptake of adenosine and adenosine diphosphate by human blood platelets. Nature (Lond.) 206 (1965): 1121-22

8. BORN,G.V.R., CROSS,M.J. : The effects of inorganic ions on the aggregation of platelets by adenosine diphosphate. J. Physiol. 168 (1963): 41-42

9. BRAUNSTEINER,H., FELLINGER,K., PAKESCH,F. : Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Blutplättchen bei Thrombasthenie. Klin.Wschr. 31 (1953): 21-24

10. BREDDIN,K., LANGBEIN,H. : Über den Einfluß verschiedener Stoffwechselhemmer auf die Thrombocytenfunktion. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 10 (1963): 29-41

11. BREDDIN,K. : Die Thrombozytenfunktion bei haemorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßkrankheiten. F.K.Schattauer-Verlag (Stuttg.) 1968

12. BRINKHOUS,K.M., READ,M.S. : Thrombocyte agglutinating factor (TAg) and adenosine diphosphate: cofactors for agglutination of swine platelets. X. Congr.intern.Soc.Haemat. Stockholm K (1964): 4

13. BRINKHOUS,K.M., READ,M.S., MASON,R.G. : Plasma thrombocyte agglutinating activity and Fibrinogen. Synergism with adenosine diphosphate. Lab.Invest. 14 (1965): 335

14. CAEN,J.P. : Is fibrinogen the plasma co-factor in ADP-induced human platelet aggregation? Nature (Lond.) 205 (1965): 1120-1121

15. CROSS,M.J. : Effect of fibrinogen on the aggregation of platelets by adenosine diphosphate. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 12 (1964): 524-527

16. DURLACH,J. : Magnesium Deficiency Thrombosis. Lancet 1 (1967): 1382-1383

17. EBERT,J.C., SCHIMMELBUSCH,C. : Die Blutplättchen und die Blutgerinnung. Virchows Arch.path.Anat. 101 (1885): 201

18. EGGELING,W. : Zur postoperativen Thromboembolie. Erfahrungen nach prophylaktischen Maßnahmen mit Magnesiumpräparaten. Münch.Med.Wschr. 101 (1959)

19. FONIO,A. : 2. internat. Magnesium-Symposium, Münster (1956)

20. GAARDERS,A., JOHNSON,J., LALLAND,S., HELLEM,A., OWREN,P.A. : Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhaesiviness of human blood platelets. Nature (Lond.) 192 (1961): 531-532

21. GAARDER,A., LALLAND,D. : Hypothesis for the Aggregation of platelets by nucleotidis. Nature (Lond) 202 (1964): 909-910

22. GROSS,R., LÖHR,G.W., VOGELL,W., WALLER,H.D., GEROCK,W., THEOPOLD,W. : Über die Natur der Thrombasthenie Klin. Wschr. 38 (1960): 193-206

23. GROSS,R. : Biochemie normaler und pathologischer Blutplättchen. Proc. VIII.Congr.Europ.Soc.Haemat. Wien. 16 (1962)

24. GROSS,R., KAHLSTORF,J., NIES,D. : Platelets aggregation from functional and biochemical points of view. X.Congr.Soc.Haemat.Stockholm. K : 3 (1964)

25. GROSS,R., SCHNEIDER,W. : Neuere Untersuchungen über den Stoffwechsel der Thrombozyten, in I. Internationales Symposium Wien 17.-20. Juni 1968 Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten. Thieme-Verlag Stuttg. (1968): 206-214

26. GROSS,R., SCHNEIDER,W. : Energy Metabolism, in JOHNSON,S.A.: The circulating platelet Academic press (1971): 135-160

27. HACKETHAL,K.H.: : Vorläufige Mitteilung über den Einfluß des Magnesiums auf die Fibrinolyse bzw. Thrombolyse. Klin.Wschr. 27 (1949): 315-316

28. HARTERT,H. : Blutgerinnungsstörungen mit der Thromboelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin.Wschr. 26 (1948): 577-583

29. HARTERT,H. : Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie: Physiologische und methodische Grundlagen der Thromboelastographie. Dtsch.Arch.Klin.Med. 199 (1952): 284

30. HARTERT,H., SCHIMPF,K. : Zur Frage der Magnesiumwirkung auf die Blutgerinnung. Klin.Wschr. 35 (1957): 50

31. HARTERT,H., LASCH,A.G., PFISTERER,J. : Charakterisierung und Funktion eines Retraktions-Cofaktors. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 1 (1957): 445-455

32. HARTERT,H. : Thrombelastography: Physical and Physiological Aspects "Flow Properties of Blood". Pergamon Press (1960): 186-198

33. HARTERT,H. : Zur Reaktionskinetik der Retraktion des Blutkuchens. Proc.VII Congr. Europ. Soc.Haemat. Wien Part II (1961): 368

34. HARTERT,H. : Clot Retraktion Kineties and Correlation with the clotting Process. Proc.IV.intern.Congr.Reology Providence (New York) (1963): 71-80

35. HOVIG,T. : The effect of calcium and magnesium on rabbit blood platelet aggregation in vitro. Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 12 (1964): 179-199

36. KERBY,G.P., TAYLOR,S.M. : The role of human platelets and plasma in the metabolism of adenosine diphosphate and monophosphate added in vitro. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 12 (1964): 510-523

37. HANZE,S. : Der Magnesiumstoffwechsel. Georg Thieme Verlag Stuttg. (1962)

38. KRÖHL,R. : Reversible und irreversible Hemmung der Thrombocytenausbreitung. Inaug.Diss.Frankf. (1967).

39. LÖHR,G.W., WALLER,H.D., GROSS,R. : Beziehungen zwischen Plättchenstoffwechsel und der Retraktion des Blutgerinnsels. Dtsch,Med.Wschr. 86 (1961): 897-904

40. LÖHR,G.W. : Stoffwechsel und Funktion der Thrombozyten. I.Intern.Symp.Wien 17.-20.Juni 1968. Stoffwechsel u. Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten. Thieme-Verlag Stuttg. (1968): 196-205.

41. LÜSCHER,E.F. : Thrombocytenfaktoren. Ergebn. Physiol. 50 (1961): 1

42. LÜSCHER,E.F. : Thrombocyten in enzympathologischer Sicht Folia haematol. M.F. 6 (1962): 84

43. LÜSCHER,E.F. : Morphologie und Physiologie der Thrombocyten. IV. Hamb. Symp. (1966): 11-20

44. MELCHIOR,N.C., MELCHIOR,J.B. : The Role of Complex Metal Ions in the Yeast-Hexokinase Reaktion J.Biol.chem. 231 (1958): 609-623

45. McDONALD,T.P., ODELL,T.T.jr., GOSSLEE,D.G. : Platelets size in relation to platelet age. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) (1964): 684

46. De NICOLA,P. : Plättchenzahl und größte thromboelastographische Amplitude bei der experimentellen Thrombocythaemie. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 3 (1959): 615

47. NIERWAROWSKI,S., THOMAS,D.P. : Platelet aggregation by ADP and thrombin Nature (Lond.) 212 (1966): 1544-1547

48. O'BRIEN,J.R. : Further observation on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate, thrombin and tri-ethyltin J.clin.Path. 16 (1963): 223-226

49. O'BRIEN,J.R. : A comparison of platelet aggregation induced by seven commounds and a comparison of their inhibitors. J. clin. Path. 17 (1964): 275-281

50. PETERSEN,H., BREDDIN,K., RÖTTGER,K. : Über die Ausführung der Thrombelastographie bei klinischen Untersuchungen. Klin. Wschr. 32 (1954): 328-329

51. PILGERAM,L.O. : Adenosine triphosphate: An inhibitor of generation of thromboplastin. Natur (Lond.) 199 (1963): 708-709

52. SALZMAN,E.W., CHAMBERS,D.A., NERT,L.L. : Incorporation of labelled nucleotidis and aggregation of human blood platelets. Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 15 (1966): 52-68

Lebenslauf

Am 20. 12. 1942 wurde ich als Tochter des gefallenen Hauptmannes Hans-Eberhard Schröder und der Journalistin Jenny Schröder in Königsberg geboren.

1949 wurde ich in Hannover eingeschult und legte dort 1963 am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Elsa-Brändstrom-Schule mein Abitur ab.

1963 - 64 absolvierte ich am Leibniz-Kolleg der Universität Tübingen ein studium-generale.

Im Wintersemester 1964 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Medizinstudium.

Am 27. 10. 1965 legte ich an der Universität Hamburg die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 27. 4. 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Am 16. 7. 1970 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen an der Universität Hamburg.

Ab Oktober 1970 bis März 1971 arbeitete ich als Medizinalassistentin am Allgemeinen Krankenhaus St. Georg der Hansestadt Hamburg. Seit April 1971 bin ich als Medizinalassistentin am Städt. Krankenhaus Kaiserslautern.

NACHWORT

Dem Direktor des Städtischen Krankenhauses Kaiserslautern, Herrn Prof.H.H a r t e r t,möchte ich ganz besonders für die tatkräftige Unterstützung und Beratung in der Durchführung des Themas danken.

Mein weiterer Dank gilt der früheren Mitarbeiterin von Herrn Prof.Hartert, der Wissenschaftlichen Rätin, Frau M.M a r c z e k , unter deren Leitung die Untersuchungen erfolgten.

Kaiserslautern, im Juni 1971

Ute Schröder